

Einfluss von endogen synthetisierten omega-3 Fettsäuren in einem Mausmodell des endotoxininduzierten Lungenversagens

Almuth Kiessling



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss von endogen synthetisierten omega-3 Fettsäuren in einem
Mausmodell des endotoxininduzierten Lungenversagens**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Almuth Kiessling
aus Hamburg

Gießen 2014

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II,
Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger,
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Mayer
Gutachter: Prof. Dr. Bein

Tag der Disputation: 06.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Vorwort	1
2.	Einleitung	2
2.1	Die akute Lungenschädigung (ALI) und das akute Lungenversagen (ARDS)	2
2.1.1	Definitionen	2
2.1.2	Epidemiologie und Mortalität	3
2.1.3	Ätiologie und Klinik	3
2.1.4	Pathophysiologie	4
2.2	Lipopolysaccharid (LPS) als Auslöser des experimentellen Lungenversagens	5
2.2.1	Auswanderung der Leukozyten	7
2.2.2	<i>Vascular Leakage</i> : Permeabilität der Lungengefäße	10
2.2.3	Zytokinsynthese	11
2.2.3.1	Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α)	12
2.2.3.2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)	13
2.2.4	Surfactant	14
2.2.5	Ventilations-Perfusions-Verhältnis	15
2.3	Körpertemperatur und motorische Aktivität bei Infektionen	16
2.4	Lipide und Lipidmediatoren	17
2.4.1	ω -6 Fettsäure: Arachidonsäure	19
2.4.2	ω -3 Fettsäuren: Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexansäure (DHA)	21
2.4.3	Eicosanoide	24
2.4.4	Resolveine	27
2.4.5	Anwendungen und Erfahrungen mit Lipiden in der Klinik	30
2.5	Fat-1 Mäuse	31
2.6	Fragestellung	32
3.	Material und Methoden	33
3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	33
3.2	Material	33
3.2.1	Experimentelle Agenzien und Pharmaka	33
3.2.2	Geräte	35
3.2.3	Zusätzliche Materialien	37
3.2.4.	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	39
3.3.1	Anästhesie	41
3.3.2	Intratracheale LPS-Instillation	41
3.3.3	Lungenhistologie	41
3.3.3.1	Organentnahme	41
3.3.3.2	Fixierung der Lunge	42
3.3.3.3	Entwässerung und Paraffin-Einbettung	42
3.3.3.4	Schnitttechnik	42
3.3.3.5	Hämatoxylin-Eosin Färbung	43
3.3.4	Broncho-alveoläre Lavage (BAL)	43
3.3.5	Zellzählung	44
3.3.5.1	Differenzierung der Leukozyten in der BAL	44
3.3.6	Auswertung des leukozytären Enzyms Myeloperoxidase (MPO)	44
3.3.6.1	Organentnahme	44
3.3.6.2	Myeloperoxidase (MPO) Aktivitäts-Assay	44
3.3.7	Proteinbestimmung	45

3.3.8	ELISA (TNF- α , MIP-2).....	45
3.3.9	Temperatur- und Aktivitätsmessung	46
3.3.9.1	Coaten der Transmitter	46
3.3.9.2	Operation der Mäuse	47
3.3.9.3	Eingewöhnungsphase	47
3.3.9.4	Stimulation mit LPS	47
3.3.9.5	Messung der Körpertemperatur und Aktivität.....	47
3.3.10	Fettsäureanalyse	48
3.3.10.1	Blutentnahme.....	48
3.3.10.2	Probenaufbereitung zur Analyse von freien Fettsäuren	48
3.4	Protokoll der Experimente	52
3.4.1	Gruppeneinteilung	52
3.4.2	Zeitlicher Verlauf	53
3.5	Statistik.....	53
4.	Ergebnisse	54
4.1	Anzahl der Versuchstiere	54
4.2	Lungenhistologie von WT und Fat-1 Mäusen vor und nach der induzierten Lungenschädigung mit LPS.....	54
4.3	Intraalveoläre Leukozyteninvasion bei WT und Fat-1 Mäusen	57
4.3.1	Leukozytenzahl in der BAL	57
4.3.2	Differenzierung der Leukozyten aus der BAL	58
4.4	Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge bei akuter Lungenschädigung	59
4.5	Proteingehalt der BAL.....	62
4.6	Bildung proinflammatorischer Zytokine bei akuter Lungenschädigung	64
4.6.1	Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α)	64
4.6.2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)	65
4.7	Motorische Aktivität und Körpertemperatur bei Mäusen mit akuter Lungenschädigung	67
4.7.1	Motorische Aktivität	67
4.7.2	Körpertemperatur.....	69
4.8	Freie Fettsäuren im Plasma.....	73
4.8.1	Arachidonsäure (AA).....	73
4.8.2	Eicosapentaensäure (EPA) und Docosapentaensäure (DHA)	74
4.8.3	Verhältnis von AA/(EPA + DHA).....	76
4.8.4	Summe aller freien Fettsäuren.....	77
5.	Diskussion	79
5.1	Das Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte akute Lungenversagen (ALI) in der Maus	79
5.1.1	Ergebnisse des LPS-induzierten akuten Lungenversagens in Wildtyp Mäusen	80
5.2	Auslösung eines Lungenversagens bei Fat-1 Mäusen	82
5.2.1	Ergebnisse des LPS-induzierten akuten Lungenversagens in Fat-1 Mäusen	82
5.3	Unterschiede des LPS-induzierten ALI in WT und Fat-1 Mäusen	83
5.3.1	Intrapulmonale Leukozyteninvasion.....	83
5.3.2	Zytokinfreisetzung bei einer akuten Lungenschädigung	85
5.3.3	Proteinkonzentration in der Lavageflüssigkeit im Zusammenhang mit der Bildung von Eicosanoiden	86

5.4	Aktivität und Temperatur, besteht ein Zusammenhang mit Resolvinen?	89
5.5	Verhalten von freien Fettsäuren bei einer Entzündung	90
5.6	Parenterale Ernährung bei Intensivpatienten mit Lipidemulsionen	92
6.	Fazit	95
7.	Zusammenfassung.....	96
8.	Summary	97
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	98
10.	Abbildungsverzeichnis	102
11.	Formeln	104
12.	Literaturverzeichnis	105
13.	Publikationsverzeichnis	113
14.	Erklärung zur Dissertation	114
15.	Danksagung.....	115

1. Vorwort

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der ω -3 und ω -6 Fettsäuren als Basis des Entzündungsstoffwechsels untersucht. Die Untersuchung im Mausmodell fokussiert sich auf den Verlauf einer durch ein Endotoxin (Lipopolysaccharid = LPS) des Bakteriums *Escherichia coli* hervorgerufenen akuten Lungenschädigung. Insbesondere sollen weitere Hinweise auf die positiven und negativen Wirkungen der einzelnen Fettsäurefamilien gewonnen werden. Der tierexperimentelle Versuch an genetisch veränderten Mäusen stellt die Möglichkeit dar, die Reaktionen von unterschiedlichen Konzentrations- und Verteilungsverhältnissen von ω -6/ ω -3 Fettsäuren ohne orale oder parenterale Zuführung von Lipiden zu untersuchen.

2. Einleitung

2.1 Die akute Lungenschädigung (ALI) und das akute Lungenversagen (ARDS)

2.1.1 Definitionen

Die akute Lungenschädigung (ALI = *Acute lung injury*) ist eine Funktionsstörung, die durch epitheliale und endotheliale Schädigungen charakterisiert wird und zu einem pulmonalen Ödem, zur Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes und schließlich zur schwereren Form, dem akuten Lungenversagen (ARDS = *Acute respiratory distress syndrome*), führt [1]. ALI und ARDS stehen für eine akute respiratorische Insuffizienz bei vorher lungengesunden Patienten und sind lebensbedrohliche Erkrankungen, die durch eine starke Permeabilitätserhöhung in beiden Lungen gekennzeichnet sind [2]. Der Austritt von Plasmaproteinen in das Interstitium und in den Alveolarraum erschwert den Sauerstoffaustausch aus der Atemluft in das Blut und den Kohlenstoffdioxidtransport aus dem Blut in die Atemluft. Durch die Ödembildung kommt es zudem zu einer Schädigung des Surfactants, was eine Erhöhung der Oberflächenspannung und somit das Kollabieren der Lungenalveolen begünstigen kann [3]. ALI und ARDS unterscheiden sich durch den Oxygenierungsindex, d.h. durch die Fähigkeit der Lunge, das durch sie fließende Blut mit Sauerstoff aufzusättigen. Zur Berechnung des Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) muss der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) durch die Sauerstoffkonzentration in der Einatemluft (FiO_2) dividiert werden. Im Normalfall beträgt der Quotient 500mmHg. Der Oxygenierungsindex beträgt beim ALI $< 300\text{mmHg}$, der beim ARDS $< 200\text{mmHg}$ [2, 4, 5].

2.1.2 Epidemiologie und Mortalität

ALI und ARDS sind seit ca. 40 Jahren klinisch bekannte Syndrome. Während dieser Zeit wurden die Risikofaktoren und die Pathophysiologie genauer verstanden und die Erkenntnisse bezüglich der Behandlung umgesetzt. Somit konnte der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden [6]. Die Einschätzungen der Inzidenz und der Mortalität für die Krankheit sind signifikant abhängig von der verwendeten Definition. Die allgemein anerkannte Definition ist die 1994 von der Amerikanisch-Europäischen-Konsensus Konferenz entwickelte [5, 6]. Gemäß Daten aus einer europäischen Langzeitstudie, die in verschiedenen Krankenhäusern an 6522 Patienten durchgeführt wurde, beträgt die Anzahl der Neuerkrankungen einer ALI oder ARDS 4,5% - 7,1%, bezogen auf alle Intensivpatienten. Dieser Wert erhöht sich auf 12,5%, wenn nur Patienten berücksichtigt werden, die länger als 24h auf einer Intensivstation behandelt wurden [7, 8]. Die Mortalitätsrate ist in den letzten 20 Jahren von 60% auf 30 – 40% gesunken [6].

2.1.3 Ätiologie und Klinik

ALI und ARDS können durch unterschiedliche Ursachen ausgelöst werden. Man unterscheidet zwischen pulmonalen und extrapulmonalen Schädigungen. Zu den pulmonalen Auslösern gehören z.B. die Aspiration von Mageninhalt, von Süßwasser/Salzwasser (Beinaheertrinken), die Inhalation toxischer Gase (z.B. NO₂, Rauchgase), hyperbarer Sauerstoff oder die Intoxikation mit Paraquat und Narkotika [2]. Das parapneumonische ARDS tritt als Folge von Pneumonien auf, besonders bei beatmeten Patienten [2]. Durch die Beatmung kann es zur ventilationsinduzierten Lungenschädigung kommen. Dabei werden die Lungenalveolen durch zu hohen Druck geschädigt, und es kommt zur Permeabilitätssteigerung, Atelektasenbildung und Inflammation [9], wodurch die eigentliche Pneumonie verstärkt wird. Zu den extrapulmonalen Auslösern zählen z.B. Sepsis, Polytrauma, Fettembolie, Verbrennung, Schock, Massentransfusion, Verbrauchskoagulopathie und akute Pankreatitis [2].

ARDS ist ein schweres Krankheitsbild, das innerhalb von Stunden zur Beatmungspflichtigkeit führen oder während einer Beatmung entstehen kann. Man kann den klinischen Verlauf in drei Stadien einteilen [2]: Im Stadium I zeigt sich Hypoxämie und Hyperventilation mit respiratorischer Alkalose. Im Stadium II kommt es zu

zunehmender Atemnot und beginnender, im Röntgenbild erkennbarer Veränderungen der Lunge, die sich durch beidseitige fleckige, streifige Verdichtungen äußern. Im dritten Stadium (III) liegen respiratorische Globalinsuffizienz (Hypoxämie und Hyperkapnie), respiratorische Azidose und bilaterale Verschattungen im Röntgenbild vor.

Durch die Gasaustauschstörung und die pulmonal-vaskuläre Widerstandserhöhung kommt es klinisch zu Tachypnoe, Dyspnoe und Zyanose [2].

2.1.4 Pathophysiologie

Beim ALI/ARDS werden durch die entzündlichen Reaktionen in der Lunge die sich in der kapillären Strombahn befindenden Leukozyten und ortsständigen Endothelzellen aktiviert. Sie lösen die Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie z.B. Zytokinen (z.B. Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6)) und Eicosanoiden (z.B. Thromboxan (Tx) B₂ und Prostaglandin (PG) E₂) aus [10]. Diese Mediatoren führen zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität, wodurch sich ein proteinreiches interstitielles Lungenödem entwickelt. Eine Störung der Surfactantfunktion ist die Folge. Dies führt zu einem vermehrten Alveolenkollaps in der Lunge [3].

Eine zusätzliche vaskuläre Dysfunktion, durch Vasokonstriktion oder Mikroembolie hervorgerufen, führt zu einer akuten Widerstandserhöhung in der pulmonalen Strombahn mit Störung der pulmonalen Perfusion [11]. Die von der Arachidonsäure abgeleiteten Eicosanoide spielen bei der Anpassung der Ventilation an die Perfusion unter inflammatorischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Sie sind antagonistisch an der Vasomotorik beteiligt, und ihre Bildung kann akut unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert werden [12, 13]. Thromboxan A₂ beispielsweise wirkt vasokonstriktorisch und erhöht die vaskuläre Permeabilität, wodurch die Ödembildung verstärkt wird [14].

Nach der akuten Phase kann sich das ARDS zurückbilden. Im Falle einer anhaltenden Entzündung kann es jedoch auch zu einer Lungenfibrose kommen. Die Lungenfibrose ist eine interstitielle Lungenerkrankung mit Zunahme des Bindegewebes. Es kommt zu einer gesteigerten Totraum-Ventilation, persistierenden Hypoxämie, Hyperkapnie, pulmonalen Hypertonie und reduzierter Compliance [2]. *Orme et al.* zeigten in

Nachuntersuchungen von ARDS-Patienten, dass bei bis zu 80% der Fälle nach einem Jahr noch Veränderungen in der Lungenfunktion zu finden waren. Es wurden eine reduzierte CO-Diffusionskapazität und zu je 20% obstruktive und restriktive Veränderungen nachgewiesen. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer reduzierten Lebensqualität [15].

2.2 Lipopolysaccharid (LPS) als Auslöser des experimentellen Lungenversagens

In dieser Arbeit verwendeten wir Lipopolysaccharid (LPS) als Auslöser für das akute Lungenversagen. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und wird aufgrund seiner Wirkung auch als Endotoxin bezeichnet [16]. Es ist ein stark proinflammatorisch wirkendes Molekül, das die endotheliale Zellantwort auf die Entzündung induziert, z.B. die vermehrte Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen [16]. Durch die proinflammatorische Eigenschaft kann es ein ALI/ARDS-ähnliches Krankheitsbild hervorrufen.

LPS besteht aus drei Teilbereichen: Einem Oligosaccharid als Kern, einem o-Antigen, das aus mehreren sich wiederholenden Polysaccharidketten besteht, und dem Lipid A, das für die proinflammatorischen Eigenschaften des LPS verantwortlich ist. Die Bindung des LPS an die Oberflächenrezeptoren der Epithelzellen und Leukozyten bewirkt deren Aktivierung. Es folgt die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen [17].

Das erste Protein, welches an der Erkennung von LPS beteiligt ist, ist das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP). Es ist ein Akut-Phase-Protein, das LPS zur Zelloberfläche transportiert, indem es LPS bindet und einen Dreifach-Komplex mit dem Oberflächenrezeptor CD 14 bildet (siehe Abb. 1). LPS kann auch ohne das LBP an CD 14 binden, jedoch ist die Affinität zur Zelloberfläche wesentlich höher bei einer Bindung an LBP [16].

Es gibt zwei Formen des CD 14 Oberflächenrezeptors: Zum einen die membrangebundene Form (mCD 14) und zum anderen die lösliche Form (sCD 14), bei der der Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) fehlt [17]. mCD 14 ist ein Glycoprotein, das auf der Oberfläche von Leukozyten zu finden ist. Es kann durch

Proteolyse von der Zelloberfläche gelöst werden, das sCD14 entsteht [17]. sCD 14 bindet freie Endotoxine und ist für die Endothelzellen von Bedeutung. Diese besitzen im Gegensatz zu den Leukozyten kein mCD 14 und benötigen sCD 14, um auf LPS reagieren zu können [18].

Die Bildung des Komplexes zwischen LPS und CD 14 ermöglicht den Transfer von LPS zum LPS-Rezeptor-Komplex, bestehend aus Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4), ein Typ 1 Transmembranprotein, und MD-2 (*Myeloid differentiation-2*), das als extrazelluläres Adaptermolekül für LPS fungiert [17]. Nur durch Bindung an den LPS-Rezeptor-Komplex kann LPS auf die Zelle wirken. Der im Zytoplasma der Zelle liegende Teil ist das intrazelluläre Adaptermolekül Toll-Interleukin 1 Rezeptor (TIR). An den TIR bindet bei Aktivierung ein weiteres Adaptermolekül, der Myeloid-Differenzierungsfaktor 88 (MyD 88) [17]. MyD 88 besitzt einen proteinreichen Bereich, die Todesdomäne (DD = *Death Domain*). Die DD kommuniziert mit einem anderen DD besitzendem Signalmolekül, der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinase 1 (IRAK 1). Eine weitere Kinase, IRAK 4, ist in der Lage, IRAK 1 zu phosphorylieren. Zusammen interagieren sie mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) und aktivieren den Inhibitor κ B ($\text{I}\kappa\text{B}$) Kinase Komplex [16]. Die Aktivierung führt zur Abspaltung des $\text{I}\kappa\text{B}$, wodurch der nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B) freigegeben wird und in den Nukleus gelangen und die Genexpression fördern kann [16, 17]. Somit kommt es zur Synthese von proinflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, wie z.B. dem Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) und dem Makrophagen-inflammatorischen Protein-2 (MIP-2) [19, 20].

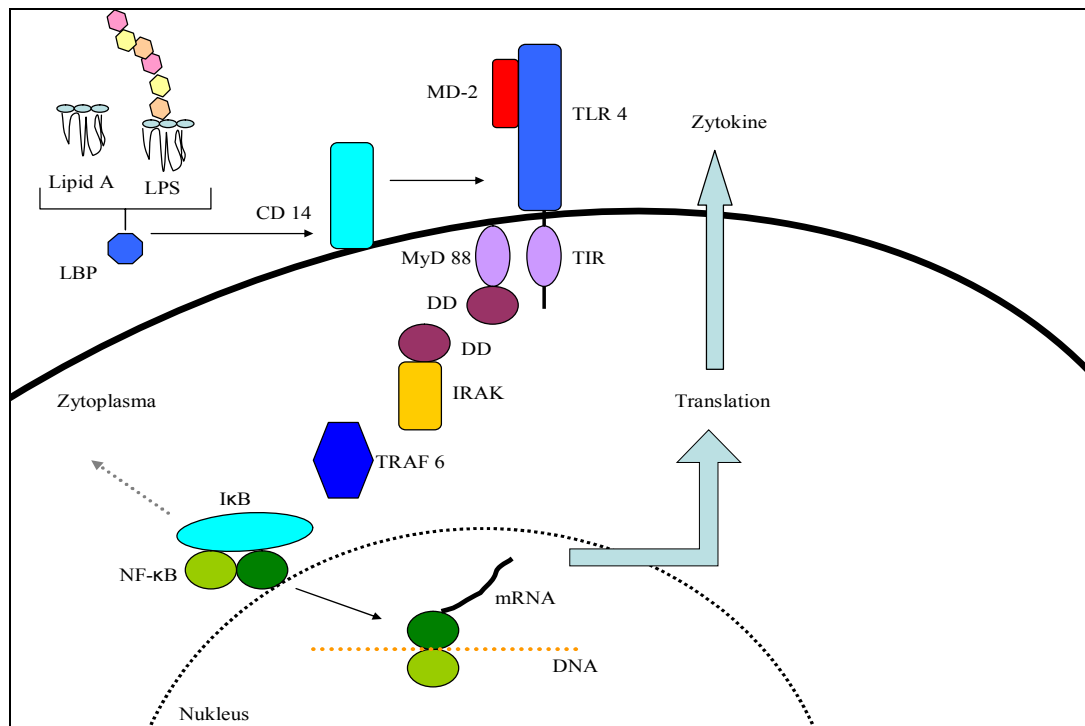


Abbildung 1: LPS induzierte Signaltransduktion

LBP und die Lipid A Struktur des LPS binden aneinander und bilden zusammen einen Komplex. Dieser Komplex koppelt an CD 14, den Rezeptor für bakterielles Endotoxin. Zusammen interagieren sie mit dem TLR 4. Die Signaltransduktion geht über MyD 88, IRAK und TRAF 6 zur Phosphorylierung von IκB und somit zur Aktivierung von NF-κB. Dieser transloziert in den Zellkern und löst die Synthese von proinflammatorischen Mediatoren aus [21].

2.2.1 Auswanderung der Leukozyten

Leukozyten gehören zu den korpuskulären Blutbestandteilen und sind ein Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie dienen der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen und können Zytokine als Antwort auf inflammatorische Stimuli synthetisieren [22]. Zu diesen proinflammatorischen Zytokinen zählt u.a. TNF-α und MIP-2, ein sog. Chemokin [23]. Zytokine sind kleine glykolysierte Proteine, die mit Membranrezeptoren interagieren und somit Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Sekretion regulieren [24]. Chemokine sind Proteine, die von verschiedenen Zellen sezerniert werden. Der Name Chemokin beschreibt, dass sie chemotaktisch wirkende Zytokine sind [25].

Um infiziertes oder entzündetes Gewebe zu erreichen, verlassen die Leukozyten in einem durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelten Prozess die Blutgefäße. Der Vorgang der Rekrutierung lässt sich in vier Schritte unterteilen:

1. Selektin-abhängiges „Rolling“ am Gefäß-Endothel

Der erste Schritt beinhaltet die Rekrutierung von Leukozyten an die endotheliale Oberfläche [17]. Nach Aktivierung durch Zytokine, wie z.B. Interleukin 1 (IL-1) und Tumor-Nekrosefaktor (TNF), induzieren diese auf der Oberfläche der in der Nähe liegenden Endothelzellen die Expression von P- und E-Selektinen (=Adhäsionsmoleküle) und auf der Oberfläche der zirkulierenden Leukozyten ohne Expression die L-Selektine. Die entstehenden sehr schwachen Selektin-Selektin-Interaktionen werden durch den Blutstrom und die dadurch entstehenden Scherkräfte immer wieder unterbrochen. Durch das permanente Binden und Lösen kommt es zu einem langsamen Rollen der Leukozyten am Gefäßendothel [17, 26].

2. Chemokin-induzierte Verstärkung der Integrin-Affinität

Die ausgeschütteten Zytokine induzieren in Makrophagen, Endothelzellen und anderen Zelltypen die Produktion von Chemokinen, z.B. das MIP-2 [24]. Durch das Selektin-vermittelte Rollen der Leukozyten am Gefäßendothel sind diese in der Lage, mit Hilfe von spezifischen Chemokin-Rezeptoren, die vorliegenden Chemokine auf der Oberfläche des Endothels wahrzunehmen. Dies bedingt eine Aktivierung von Integrinen auf Leukozyten, einer weiteren Gruppe der Adhäsionsmoleküle. Es kommt zu einer Erhöhung der Affinität und dadurch zu einer festeren Adhäsion der Zellen an das Endothel und einem verlangsamten Rollen [17, 26, 27].

3. Stabile Integrin-induzierte Adhäsion an das Endothelium

Die Aktivierung der Integrine auf Leukozyten und Monozyten verläuft gleichzeitig mit der Exprimierung einer weiteren Gruppe von Adhäsionsmolekülen, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), auf der Zelloberfläche des Endothels [17]. Diese binden sich an die Integrine der Leukozyten. Die Expression dieser Liganden wird ebenfalls durch Chemokine induziert. Dies führt zusammen mit der erhöhten Integrin-Affinität zu einer festen Bindung an das Endothelium. Durch die starke Adhäsion kommt es zu Veränderungen des Zytoskeletts, als auch zu einer abgeflachten Positionierung der Leukozyten auf das Endothel [17, 26].

4. Transmigration

Schließlich erfolgt die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel in das darunter liegende Gewebe. Dieser Vorgang wird durch die Bindung der Integrine an die Adhäsionsmoleküle des Endothels VCAM-1 und ICAM-1 ermöglicht [26, 28].

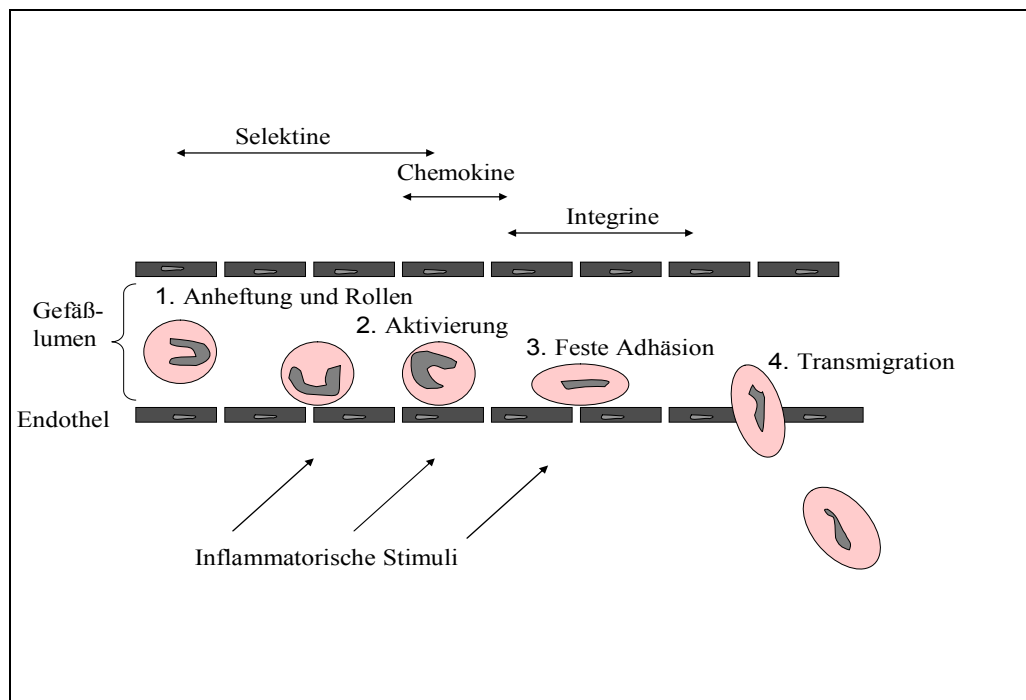


Abbildung 2: Die Adhäsionskaskade: Kontakte zwischen Leukozyten und Endothelzellen

Dargestellt ist die Auswanderung der Leukozyten aus dem Gefäßlumen ins Gewebe. Die Leukozyten treten mit aktivierten Endothelzellen in Kontakt. Zuerst kommt es zum Selektin-abhängigen Rollen, dann zur Chemokin-vermittelten Verstärkung der Integrin-Affinität und zur stabilen Integrin-vermittelten Adhäsion an das Endothel. Schließlich kommt es zur Transmigration der Leukozyten durch das Endothel in das darunter liegende Gewebe [27].

2.2.2 *Vascular Leakage*: Permeabilität der Lungengefäße

Beim ARDS kommt es zu einer Permeabilitätserhöhung in beiden Lungen [2]. Der Flüssigkeitsaustausch zwischen den Gefäßen, dem Interstitium und dem Lymphsystem wird in der Lunge über ein Netzwerk transvaskulärer Gradienten für hydrostatische und kolloidosmotische Drücke reguliert [29]. Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen der Filtration der Flüssigkeit aus dem arteriellen Kapillarschenkel ins Interstitium und der Reabsorption in den venösen Kapillarschenkel und ins Lymphsystem ein Gleichgewicht, das ausschließlich durch die oben genannten Druckgradienten reguliert wird [30]. Ist diese Homöostase durch beispielsweise eine gesteigerte Kapillarpermeabilität beeinträchtigt und durch inflammatorische Mediatoren gestört, kommt es zu einer vermehrten Filtration ins Interstitium und einer daraus folgenden Ödembildung. Dies führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Filtration und Reabsorption von Flüssigkeit im interstitiellen Raum [29, 30]. Da das Ödem einen hohen Proteingehalt hat, bewirkt dies aufgrund des aus den Gefäßen nachfolgenden Wassers, dem sogenannten *solvent drag*, eine Flüssigkeitsansammlung in den Alveolen [31]. Daraus resultieren eine Gasaustauschstörung und eine verstärkte Inaktivierung und Verdünnung des Surfactants. Surfactant wird in den alveolären Flüssigkeitsfilm sezerniert und bewirkt eine Herabsetzung der Oberflächenspannung in den Alveolen. Bei Inaktivierung kommt es zu einem Kollaps der Alveolen und letztendlich zu einem verringerten Gasaustausch [3, 32]. Zudem entsteht eine vaskuläre Dysfunktion mit akuter Widerstandserhöhung in der pulmonalen Strombahn. Ein solcher Prozess findet bei einer akuten Lungenschädigung statt [31].

Ein weiterer Faktor, der zur Ödembildung führt, ist das aus der Arachidonsäure (AA) synthetisierte Prostazyklin (PGI_2). Es wirkt in vielen Gefäßgebieten vasodilatierend, dadurch verlangsamt sich der Blutfluss, die Permeabilität des Endothels wird erhöht, die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten wird erleichtert, Flüssigkeit und Zellen treten in die Alveolen über [33].

Auch das aus AA gebildete Thromboxan A_2 (TxA_2) vermittelt entzündungsverstärkende Prozesse. So steigert es die vaskuläre Permeabilität und begünstigt eine Ödembildung. Zudem wirkt es vasokonstriktorisch auf glatte Muskulatur, unterstützt die Widerstandserhöhung in der pulmonalen Strombahn und wirkt proinflammatorisch, indem es Leukozyten aktiviert und sie mittels chemotaktischer Signale zum Ort der Entzündung leitet [14, 33, 34].

2.2.3 Zytokinsynthese

Zytokine sind niedermolekulare Glykoproteine die das Verhalten oder die Eigenschaften anderer Zellen ändern [35] und in dieser Arbeit im Zusammenhang mit Inflammation untersucht werden. Sie kontrollieren und regulieren eine große Anzahl physiologischer Prozesse, wie z.B. die Regulation der inflammatorischen Immunantwort und Fieber oder die Proliferation, Differenzierung und den Metabolismus von Zellen [22].

Im Falle einer Entzündung werden sie von aktivierten Zellen, den sogenannten Effektorzellen, sezerniert. Zu den Effektorzellen gehören unter anderem die Monozyten und Alveolarmakrophagen, die sich in den Alveolen befinden und monozytärer Herkunft sind. Sie phagozytieren aerogen aufgenommenes oder örtlich freigesetztes Material und sind die initialen Aktivatoren der Entzündungskaskade [36]. Nach Aktivierung der Effektorzellen, durch beispielsweise LPS, sezernieren diese Zytokine, wie z.B. den Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α). TNF- α initiiert dann die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin (IL)-1 β oder IL-6. IL-1 β aktiviert Leukozyten und erhöht die Bildung von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen, so dass es zu einer vermehrten Leukozytentransmigration kommen kann. IL-6 erhöht die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber und aktiviert so die unspezifische Immunantwort [37].

Nach Bindung des Zytokins an einen Rezeptor wird eine Signaltransduktion in der Effektorzelle mit Bildung von intrazellulären Botenstoffen, den sogenannten *second messenger*, induziert. Die Sensitivität einer Effektorzelle gegenüber dem bestimmten Zytokin hängt unter anderem von der Anzahl der zur Verfügung stehenden Zytokinrezeptoren ab [38]. Es wird zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen unterschieden. Die Bildung proinflammatorischer Mediatoren wird beispielsweise durch infektiöse oder traumatische Ereignisse eingeleitet. TNF- α und IL-1 β sind essentielle Mediatoren der proinflammatorischen Kaskade [39]. Zu ihren Aufgaben gehört die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die für die Leukozytenmigration notwendig ist [40].

Als weitere Mediatoren, die durch inflammatorische Stimuli wie z.B. LPS von Endothelzellen, Alveolarmakrophagen und Epithelzellen gebildet werden, zählen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [37]. Sie schädigen das Endo- und Epithel,

unterstützen die Leukozytenadhäsion und erhöhen ebenfalls die vaskuläre Permeabilität [41].

Stickstoffmonoxid zählt zu den vasoaktiven Mediatoren, die die Entzündungsantwort bedeutend mit beeinflussen [42].

Die antiinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. IL-4, IL-10 und IL-13 unterdrücken die Gensynthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Leukozyten. Damit wird der Inflammation mit Ödembildung und Leukozytenwanderung entgegengewirkt und diese reguliert [37].

2.2.3.1 Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α)

Während der letzten zehn Jahre haben Studien gezeigt, dass TNF- α eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Entzündungsantwort in der Lunge spielt [24]. TNF- α ist ein Zytokin, das unter anderem von Makrophagen, Monozyten, Leukozyten, glatten Muskelzellen und Mastzellen ausgeschüttet wird. Es stimuliert über parakrine und autokrine Wege Zellen, welche dann Chemokine freisetzen [24].

Physiologische Stimulantien für die Synthese von TNF- α sind unter anderem IL-1, bakterielles Endotoxin, *platelet-derived growth factor* (PDGF) und Onkostatin M [43].

TNF- α besitzt verschiedene Bioaktivitäten, wie z.B. die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, die Stimulation der Synthese von Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6) und die Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus [24].

TNF- α wird zunächst als ein membrangebundenes Protein (memTNF) präsentiert. Die extrazelluläre Fraktion wird dann von dem TNF- α konvertierenden Enzym (*TNF- α converting enzyme*, TACE) abgespalten und ein lösliches bioaktives Zytokin entsteht (solTNF). Das solTNF wirkt parakrin auf benachbarte Zellen. In Studien wurde mehrfach gezeigt, dass auch das memTNF als Zell-zu-Zell-Botenstoff bioaktiv ist [24, 43, 44].

TNF- α wirkt über zwei Rezeptoren, den Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) 1 und den TNF-R2. TNF-R1 ist in fast allen Geweben vorhanden und kann komplett von der membrangebundenen und löslichen Form des TNF- α aktiviert werden [45]. TNF-R2 ist lediglich auf Zellen des Immunsystems zu finden und nur durch die membrangebundene

Form des TNF- α zu aktivieren [45]. Die Bindung verursacht eine Konformationsänderung, welche dazu führt, dass ein Adapterprotein, das TNF-Rezeptor-assoziierte Todesdomänen Protein (TRADD), an die Todesdomäne bindet und so drei unterschiedliche Signalwege aktivieren kann [46]:

1. Aktivierung des nuklearen Faktors- κ B (NF- κ B): NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von zahlreichen proinflammatorischen Proteinen steuert [45].
2. Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK): TNF- α induziert eine starke Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), die c-Jun phosphoryliert und somit deren Transkriptionsaktivität erhöht. Diese Kinasen sind in die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose involviert [45].
3. Induktion des Zelltods: TNF- α -induzierter Zelltod spielt nur eine eingeschränkte Rolle im Vergleich zu den Funktionen im Entzündungsprozess. Wie andere Todesrezeptoren kann TNF-R1 über eine zytoplasmatische Todesdomäne den Zelltod induzieren. Bei Bindung an den TNF-R1 wird, wie oben beschrieben, die TRADD aktiviert, daraus folgt eine Aktivierung des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktors 2 (TRAF2) und der Fas-assoziierten Todesdomäne (*Fas-associated death domain*, FADD). Schließlich wird die Apoptose über die Aktivierung unterschiedlicher Kaspasen ausgelöst [45, 46].

Über die Ausschüttung von IL-1 β stimuliert TNF- α fast alle Leukozyten und induziert die Freisetzung von IL-6 aus den Zellen des Immunsystems (aktivierte Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen). Außerdem wirkt TNF- α mit IL-6 synergistisch als Aktivator einiger Akut-Phase-Proteine sowie der Komplementkaskade und fördert am Endothel die Adhärenz von Leukozyten und damit die Diapedese von weiteren Leukozyten in das Entzündungsgebiet [47, 48].

2.2.3.2 Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)

MIP-2 ist ein von Makrophagen sezerniertes Protein, das eine lokalisierte Entzündungsreaktion auslösen kann und die Chemotaxis für Leukozyten an den Ort der

Entzündung fördert [49]. Das Protein ist ein Chemokin und erfüllt ähnliche Funktionen wie das humane Interleukin 8 (IL-8) [25]. MIP-2 bindet an den CXC-Chemokinrezeptor-2 (CXCR2), der sich an der Oberfläche der Neutrophilen in Mäusen befindet [50]. CXCR2 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der über Aktivierung eines Raf Proteins die „*extracellular signal-regulated kinase*“ (ERK) aktiviert, welche wiederum im aktivierten Zustand in den Zellkern gelangt und dort die Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert [51].

Die Interaktion der Zytokine, der Adhäsionsmoleküle und der Chemokine verstärkt die Leukozyteneinwanderung in das Lungengewebe. Alveoläre Makrophagen sind wichtig für die Generierung von Chemokinen in den Luftwegen. Nach Einfluss von Endotoxin, z.B. LPS und gram-positiven Zellwandprodukten, reagieren die alveolären Makrophagen sofort mit einer erhöhten Produktion von Chemokinen [42].

Die Sequenzen der Chemokine weisen untereinander hohe Homologien auf und sind durch 4-Cystein-Sequenzen charakterisiert. Sie unterscheiden sich in Struktur und Funktion. Es gibt zwei Hauptzweige: Die CXC Gruppe zeigt eine strukturelle Sequenz, in der die zwei ersten Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind. Zu dieser Gruppe gehört MIP-2/IL-8. Der andere Zweig hat eine C-C Sequenz, d.h., die ersten zwei Cysteine sind miteinander verbunden. Hierzu gehört das MIP-1 [24].

2.2.4 Surfactant

Surfactant ist eine oberflächenaktive Substanz in den Alveolen, die beim ARDS geschädigt werden kann. Es ist ein lecithinhaltiges, an Globulin gebundenes Phospholipid, dessen Name sich aus den Wörtern „*surface active agent*“ ableitet. Es überzieht das Alveolarepithel von innen und setzt die Oberflächenspannung in den Alveolen herab. So wirkt es beispielsweise der Entstehung von Atelektasen entgegen. Surfactant wird von den Alveolarepithelzellen Typ II (AT II) in der Lunge gebildet. Die AT II produzieren, sezernieren und recyceln die Lipid- und Proteinkomponenten des Surfactants [32, 35].

Eine Schädigung des Surfactant-Systems kann z.B. durch ein alveoläres Lungenödem ausgelöst werden. [3, 52].

2.2.5 Ventilations-Perfusions-Verhältnis

Die Atmung dient dem Gasaustausch zwischen Körper und Umgebung, d.h. die Aufnahme von Sauerstoff und die Abgabe von CO_2 . Die Atmung lässt sich untergliedern in:

1. Gasaustausch zwischen Umgebung und Lunge
2. Gasaustausch zwischen Lunge und Blut
3. Gastransport im Blut
4. Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe [53]

Der Gasaustausch zwischen Lunge und Blut, der für einige Aspekte dieser Arbeit von Bedeutung ist, geschieht durch Diffusion. Aus dem alveolaren Gasgemisch gelangt der Sauerstoff dem Partialdruckgradienten folgend in das Blut. CO_2 gelangt durch den Partialdruckgradienten aus dem Blut in die Alveolarluft [54].

Das Verhältnis der Ventilations (V)- und Perfusions (Q)-Rate in der Lunge ist ein Maß für die Effizienz des Gasaustausches [55]. Ventilation ist die Fähigkeit, Luft in und aus den Atemwegen zu bewegen [56]. Perfusion ist die Durchblutung der einzelnen Lungenabschnitte und ist für den An- und Abtransport der Gase mit dem Blut zuständig [53]. Die Perfusion zeigt regionale Unterschiede in der Lunge. Der Druck der Arteria pulmonalis ist mit 10-25mmHg niedrig, so dass eine hydrostatische Druckdifferenz zwischen der Lungenspitze und –basis bei aufrechter Haltung beim Menschen besteht. Die basalen Abschnitte der Lunge sind somit stärker durchblutet als die apikalen Anteile. Dadurch gibt es regionale Unterschiede beim Ventilations-Perfusions-Verhältnis (V/Q-Verhältnis). Es liegt bei ca. 0,5 in der Basis und 3,0 in der Lungenspitze. In der Gesamtlunge beträgt das Verhältnis unter Ruhebedingungen ca. 1 [53].

Es gibt viele Faktoren, die den Gasaustausch und somit auch das V/Q-Verhältnis beeinflussen, z.B. Alter, Körperhaltung, Sauerstoffgehalt der Atemluft und Pathologie der Lunge [55]. Solchen Veränderungen des V/Q-Verhältnisses wirkt ein Regulationsmechanismus entgegen: die hypoxische Vasokonstriktion [53]. Wird die Lunge in einigen Abschnitten schwach ventiliert, z.B. bei obstruktiven oder restriktiven Lungenerkrankungen (COPD, Tumore, Lungenfibrose oder Pleuraerguss), verschiebt sich das V/Q-Verhältnis zu Gunsten der Perfusion. Der sinkende PO_2 löst eine Vasokonstriktion aus, so dass sich das V/Q-Verhältnis wieder der Norm nähert [53, 56].

ARDS hat auch einen Einfluss auf das Ventilations-Perfusions-Verhältnis. Es kommt zu einer Störung der Anpassung von Q an V.

2.3 Körpertemperatur und motorische Aktivität bei Infektionen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Körpertemperatur und die motorische Aktivität der Mäuse mit ARDS im Hinblick auf das unterschiedliche ω -6/ ω -3-Fettsäureverhältnis in den Mäusegruppen untersucht.

Während einer Infektion entstehen für eine Entzündung charakteristische und zentral kontrollierte Zeichen des „Krankseins“, auch als „Krankheitsverhalten“ (*sickness behavior*) bezeichnet. Dieser Symptomkomplex beinhaltet die Entstehung von Fieber, Appetitverlust, vermehrte Schlafphasen, reduzierte motorische Aktivität, verminderte Libido und herabgesetzte Wachsamkeit [57]. Fieber ist durch eine steigende Körpertemperatur aufgrund eines erhöhten Sollwertes charakterisiert und nicht wie die Hyperthermie durch überschießende Aktivität der Thermoregulatoren verursacht [57]. Es ist nicht auf bakterielle und virale Infektionen beschränkt, sondern tritt auch im Rahmen von Traumata, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen auf [57]. Bei der Entstehung von Fieber wirken Zytokine wie IL-6 oder TNF- α mit, die auch als endogene Pyrogene bezeichnet werden. Das Kontrollzentrum der Thermoregulation befindet sich im Hypothalamus. Es gibt drei Mechanismen, auf welchem Weg die fieberverursachenden Zytokine in das Gehirn zum Hypothalamus gelangen.

1. Im Blut zirkulierende Zytokine können an Positionen wirken, wo es eine Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke gibt, z.B. der Lamina terminalis im dritten Ventrikel.
2. Endogene Pyrogene können mit spezifischen Rezeptoren der Endothelzellen interagieren und die Bildung von spezifischen Enzymen aktivieren.
3. Es gibt aktive Transportsysteme für die speziellen Zytokine, z.B. für IL-6 und TNF- α [57, 58].

Die zum Hypothalamus gelangten Zytokine müssen die Produktion und Freisetzung von fieberverursachenden Mediatoren veranlassen. Der wichtigste Mediator für Fieber ist Prostaglandin E_2 (PGE₂). Er ist verantwortlich für die Erhöhung des temperaturregulierenden Sollwertes. Es wurde gezeigt, dass die Injektion von PGE₂ in

die Ventrikel Fieber verursacht, oder dass die Konzentration von PGE_2 im Blut und Gehirn sich parallel zur Temperaturänderung im Körper ändert [57].

Sepsis beeinflusst die Körpertemperaturregulation und führt entweder zu Fieber oder Hypothermie. In einigen Studien wurde die Auswirkung von Fieber bzw. Hypothermie auf den Krankheitsverlauf der Sepsis untersucht. Man kam zusammenfassend zu dem Ergebnis, dass eine hohe Körpertemperatur gut und eine niedrige Körpertemperatur im Vergleich schlecht ist, da bei Hypothermie der Energiehaushalt des Organismus sinkt [59]. Eine Infektion verläuft in zwei Phasen: Die frühe Phase ist durch Fieber, motorische Aktivität und Hyperalgesie charakterisiert. Die späte Phase gibt die systemische Antwort auf die Infektion wieder. Sie ist beschrieben mit Hypothermie oder Fieber, Hypoalgesie und verminderter motorischer Aktivität. Kommt es zu einer Hypothermie, sind mit einer sinkenden Körpertemperatur die metabolischen Abläufe im Gewebe verringert - bei 1°C Kälteverlust sind das ca. 10% weniger -, so dass der Energiehaushalt erniedrigt ist [59].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Sepsis durch Fieber bzw. Hypothermie sowie verminderte motorische Aktivität charakterisiert ist. Fieber ist im gewissen Maß für den Krankheitsverlauf günstig. Hypothermie könnte von Vorteil sein, wenn der Schaden so groß ist, dass der Patient bereits im Energiedefizit ist und so durch die verringerten metabolischen Abläufe Energie spart [59].

2.4 Lipide und Lipidmediatoren

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Wirkung der ω -3 und ω -6 Fettsäuren im Entzündungsstoffwechsel, weshalb im folgenden Abschnitt auf Lipide, Fettsäuren und deren Metabolite eingegangen wird.

Lipide (Fette) ist eine Sammelbezeichnung für wasserunlösliche Naturstoffe. Die Wasserunlöslichkeit beruht auf den langen Kohlenwasserstoffresten der Lipidmoleküle. Sie kommen als Strukturkomponenten in Zellmembranen, Energiespeichern oder als Signalmoleküle vor. Die Fette teilen sich in unterschiedliche Untergruppen auf, zum einen nach Art ihrer Fettsäuren und zum anderen nach Art ihrer Grundgerüste [22]. Dazu gehören die Fettsäuren, Triacylglyceride (Fette und Öle), Wachse, Phospholipide, Sphingolipide, Lipopolysaccharide und Isoprenoide (Steroide) [60].

Fettsäuren bestehen aus unterschiedlich langen Kohlenstoffatomketten und einer Carboxylgruppe (-COOH). Man kann sie in physiologisch und chemisch verschiedene Klassen einteilen, die essentiellen und nicht-essentiellen Fettsäuren und die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren [22].

Zu den essentiellen Fettsäuren, d.h. Fettsäuren, die nicht vom Körper aus Nährstoffen synthetisiert werden können, gehören z.B. die Linol- und Linolensäuren. Aus diesen werden die Arachidonsäure (AA), die Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA) metabolisiert. Die nicht-essentiellen Fettsäuren können vom Körper hergestellt werden und sind somit nicht von der Nahrungszufuhr abhängig [22].

Die ungesättigten und gesättigten Fettsäuren unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur. Die ungesättigten Fettsäuren besitzen Doppelbindungen und können durch Radikale (z.B. Sauerstoffatome) oxidiert werden. Die Radikale werden unter Aufspaltung der Doppelbindung in eine Einfachbindung an die Fettsäure gebunden [60]. Wichtig für die vorliegende Arbeit sind die essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Zu diesen Fettsäuren gehören u.a. die ω -3 Fettsäuren (Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA)) und die ω -6 Fettsäuren (Linolensäure und Arachidonsäure (AA)). Für die vorliegende Arbeit sind die AA, EPA und DHA von Bedeutung.

Lipide, Lipidmediatoren und Entzündung sind eng miteinander verzahnt [61]. Eine Entzündung ist ein komplexer Ablauf, bei dem viele Faktoren mitwirken. Sobald die Entzündungskaskade aktiviert ist, spaltet das Enzym Phospholipase A₂ (PLA₂) Fettsäuren aus der Zellmembran ab, die dann als Stoffwechselausgangsprodukt der Zelle zur Verfügung stehen und durch weitere Metabolisierung bei der Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle spielen [62, 63].

In der frühen Phase einer Entzündung werden große Mengen an Lipidmediatoren freigesetzt. Sie spielen bei der auto- und parakrinen Regulation des inflammatorischen Leukozytenverhaltens eine zentrale Rolle. Zu den Lipidmediatoren zählen die Oxygenierungsprodukte der AA, der EPA und der DHA, auf die im Kapitel 2.4.3 genauer eingegangen wird [64].

2.4.1 ω -6 Fettsäure: Arachidonsäure

Arachidonsäure (AA), deren chemischer Name 5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure lautet, ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen (C20:4 (ω 6); Abb. 3), die entweder aus der essentiellen ω -6 Fettsäure Linolsäure synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen wird [22]. Die letzte Doppelbindung liegt sechs Kohlenstoffatome von der endständigen Methylgruppe entfernt, daher gehört AA zu den ω -6 Fettsäuren. Sie ist vor allem als Lipidbestandteil in Zellmembranen vorhanden und kann aus Membranphospholipiden mit Hilfe des Enzyms Phospholipase A₂ zur Verfügung gestellt werden [22].

AA ist das Substrat der proinflammatorischen Eicosanoide und wird bei inflammatorischer Aktivierung der Zelle von der Cyclooxygenase, der Lipxygenase und dem Cytochrom P450 metabolisiert [62]. Die durch die Cyclooxygenase entstandenen Metabolite sind Prostaglandine (PG) und Thromboxan (Tx). Über die Lipxygenase werden die Leukotriene (LT) und die Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) gebildet, und über den Cytochrom P450 abhängigen Signalweg wird die Bildung der Epoxyeicosatriensäuren (EET) katalysiert. Diese Lipidmediatoren regulieren die Zellproliferation und Inflammation [62].

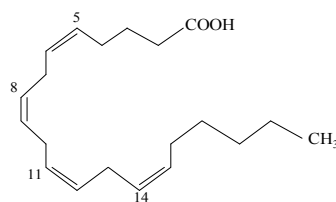


Abbildung 3: Arachidonsäure

Cyclooxygenasen (COX), die sich frei im Zytosol befinden, spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Entzündungsgeschehens. Es sind zwei Isoenzyme der COX bekannt, COX-1 und COX-2. COX-1 ist konstitutiv in fast allen Zellen exprimiert, die

Expression von COX-2 kann nach inflammatorischer Aktivierung oder in Tumorzellen gesteigert werden [65]. Sie sind wesentliche Enzyme zu Beginn der Prostaglandinsynthese. Mit ihrer Hilfe wird Arachidonsäure durch eine Bis-Dioxygenierung in Prostaglandin G_2 synthetisiert und dann über die Peroxidase in Prostaglandin H_2 katalysiert [65]. Dies ist wichtig für die Synthese nachfolgender Prostaglandine. Mit Hilfe unterschiedlicher Prostaglandinsynthasen werden PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, Prostazyklin (PGI_2) und Thromboxan (TxA_2) synthetisiert. Die Prostaglandine der Serie-2 spielen bei der Inflammation eine besondere Rolle und haben je nach Rezeptor, den G-Protein-gekoppelten-Rezeptor oder den nukleären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor [66], und je nach Signalweg unterschiedliche Effekte, wie z.B. Vasodilatation, Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation und Bronchokonstriktion [66].

Im Gegensatz zu der ubiquitär vorkommenden COX-2 ist das Enzym 5-Lipoxygenase (5-LOX) nur in myeloiden Zellen vorhanden. Außerdem benötigt 5-LOX stets einen Stimulus, um seine Produkte zu synthetisieren. Dies geschieht durch Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels oder durch Phosphorylierung des Enzyms. Die 5-Lipoxygenase synthetisiert das instabile Hydroperoxid 5-HPETE (5-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure), das durch eine Hydroxyperoxidase in 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) umgewandelt werden kann. In einem weiteren Schritt entsteht aus 5-HPETE durch die LTA_4 -Synthetase das sehr instabile Zwischenprodukt Leukotrien A_4 (LTA_4). Dies wird über weitere Enzyme in das stark proinflammatorisch wirkende Leukotrien B_4 (LTB_4) bzw. die cysteinylhaltigen Leukotriene LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 metabolisiert [67-69].

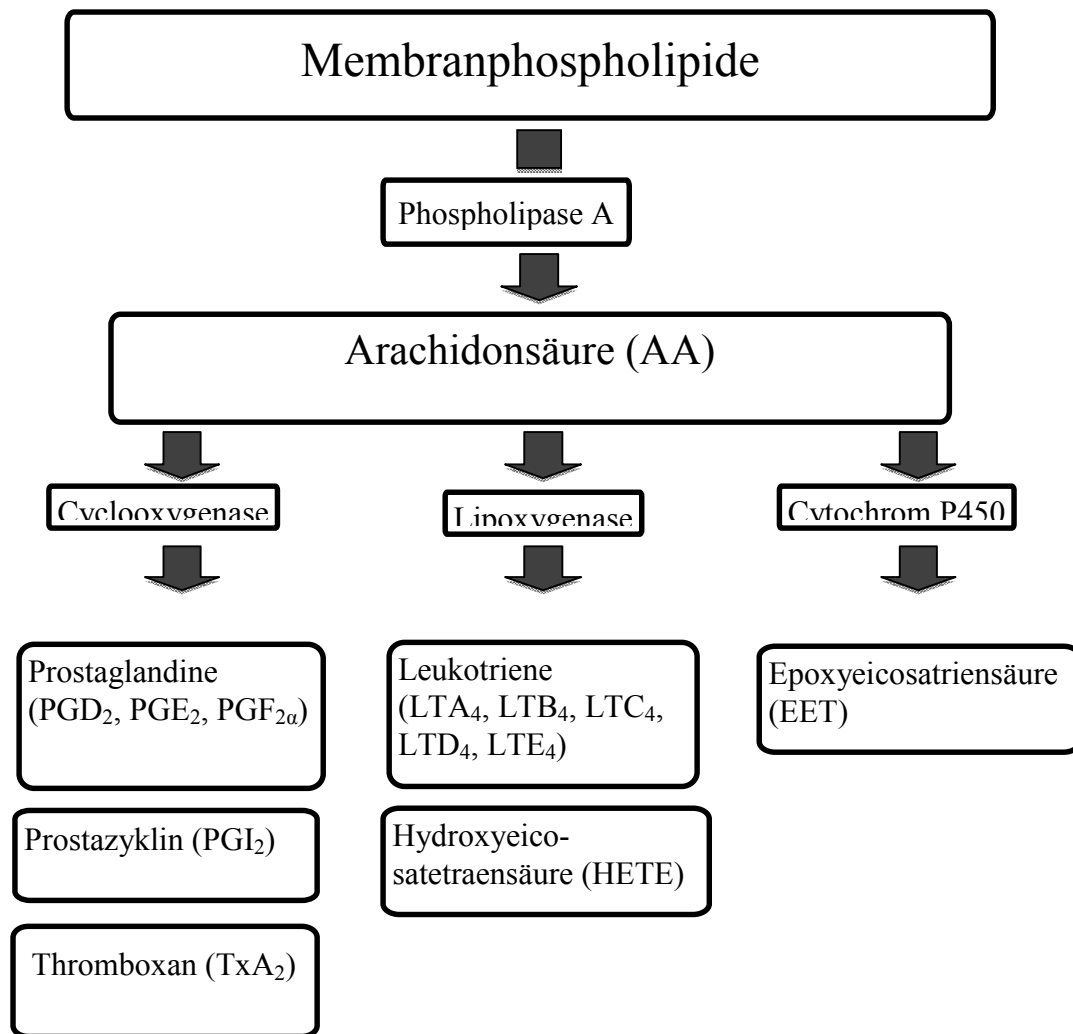


Abbildung 4: Darstellung der Metabolisierung der Arachidonsäure (AA).

Die Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenase in PG, Tx und PGI metabolisiert, durch die Lipoxygenase in LT und HETE und durch das Cytochrom P450 in EET.

2.4.2 ω -3 Fettsäuren: Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexansäure (DHA)

Bei den ω -3 Fettsäuren liegt die letzte Doppelbindung drei Kohlenstoffatome von der endständigen Methylgruppe entfernt, daher werden sie auch ω -3 Fettsäuren genannt. EPA ist eine fünffach ungesättigte Fettsäure und besteht insgesamt aus 20 Kohlenstoffatomen (C20:5 (ω 3); Abb. 5). Der chemische Name lautet 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure [22, 60].

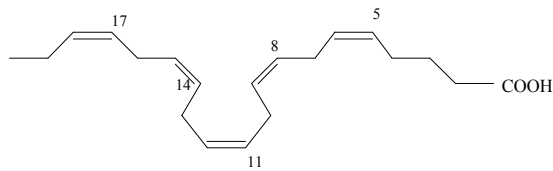


Abbildung 5: Eicosapentaensäure

DHA ist eine sechsfach ungesättigte Fettsäure und besteht aus 22 Kohlenstoffatomen (C22:6 (ω3), Abb. 6). Der chemische Name lautet 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-Docosahexaensäure [22, 60].

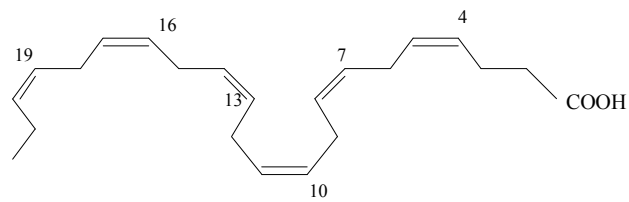


Abbildung 6: Docosahexaensäure

Die ω -3 Fettsäuren bilden einen relevanten Teil des Fettes in Kaltwasserfischen und Robbenfleisch, so dass der Verzehr von diesen Fischen die Aufnahme von ω -3 Fettsäuren ermöglicht [70].

EPA kann wegen der strukturellen Ähnlichkeit zur AA von der Cyclooxygenase und Lipoxygenase als Substrat verwendet werden. Sie konkurriert mit AA auf der Ebene der Cyclooxygenase und Lipoxygenase um die Prostaglandin- und Leukotriensynthese. Die COX-2 metabolisiert die EPA wie die AA mittels einer Bis-Dioxygenierung zu dem Zwischenprodukt PGG₃ und dem Endoperoxid PGH₃. Aus dem Endoperoxid werden alle folgenden Prostaglandine der 3er-Serie abgeleitet [70].

Der erste Schritt des Lipoxygenase-Stoffwechselweges ist analog zur Oxidation der AA. Zuerst kommt es zur Bildung eines instabilen Hydroperoxids (5-Hydroperoxyeicosapentaensäure, 5-HPEPE), das mit Hilfe einer Hydroperoxidase in die 5-Hydroxyeicosapentaensäure (5-HEPE) umgewandelt werden kann. Alternativ wird 5-HPEPE durch eine Dehydratase zu dem instabilen Epoxid Leukotrien A₅ (LTA₅) metabolisiert. LTA₅ kann zu unterschiedlichen Metaboliten umgewandelt werden. Die LTA-Hydrolase in Granulozyten oder Makrophagen katalysiert die enzymatische Umwandlung zu Leukotrien B₅ (LTB₅) [70, 71]. Aus der Zusammenarbeit von Granulozyten und Endothelzellen entsteht aus LTA₅ das LTC₅ [72].

Nimmt der Mensch vermehrt ω -3 Fettsäuren, z.B. in Form von Fisch oder ω -3 Kapseln, zu sich, so kommt es zu einer Veränderung des Verhältnisses der gebildeten Metabolite. Es kommt zu einer verminderten Produktion von TxA₂, PGE₂, PGI₂ und LTB₄. Metabolite der EPA, d.h. TxA₃, PGE₃, PGI₃ und LTB₅ werden verstärkt gebildet. Die von EPA abgeleiteten Leukotriene der 5er-Serie, die durch 5-Lipoxygenase generiert werden, und die Cyclooxygenaseprodukte Thromboxan A₃, Prostaglandin E₃ und Prostazyklin I₃ zeigen eine deutlich reduzierte inflammatorische und vasomotorische Wirksamkeit im Vergleich zu den von der AA abgeleiteten Mediatoren [63, 73-75].

Aus der EPA werden zudem Resolvine der E-Serie gebildet. Auch aus der DHA werden durch COX und LOX die sogenannten Docosanoide gebildet, zu denen die Docosatriene, Resolvine der D-Serie und Neuroprotektine, auf die im Kapitel 2.4.4 genauer eingegangen wird, zählen. *Bazan* und Kollegen waren Mitte der 80er Jahre des 20ten Jahrhunderts die Ersten, die den Namen Docosanoide prägten [76].

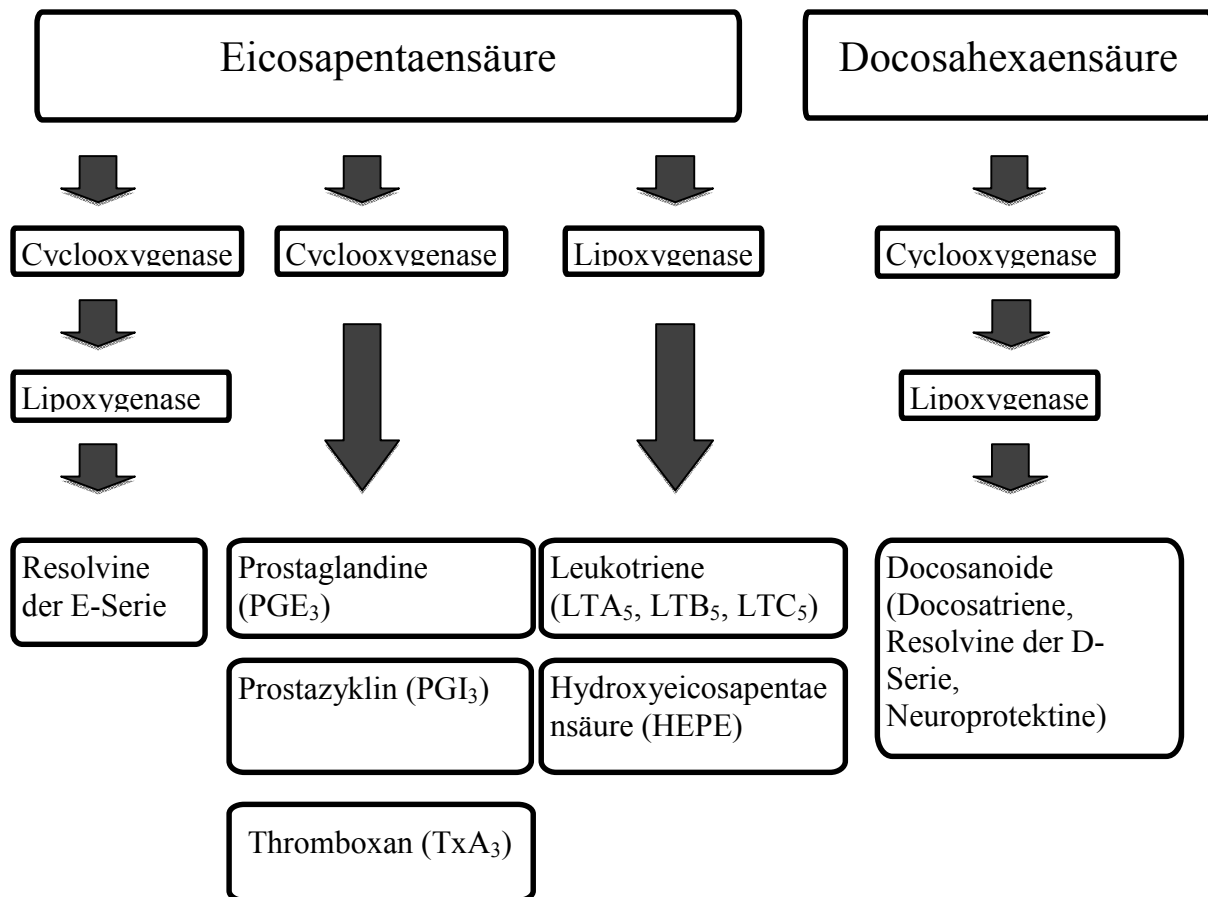


Abbildung 7: Darstellung der Metabolisierung der Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure

Die Eicosapentaensäure wird wie die Arachidonsäure von der Cyclooxygenase und Lipoxygenase als Substrat genutzt. Die Cyclooxygenase metabolisiert die EPA zu Prostaglandin, Thromboxan und Prostacyclin. Die Lipoxygenase metabolisiert die EPA zu Leukotrien und Hydroxyeicosapentaensäure. Resolvine der E-Serie werden über die Cyclooxygenase und die Lipoxygenase metabolisiert. Die Docosahexaensäure wird zu Docosanoiden verstoffwechselt.

2.4.3 Eicosanoide

Eicosanoide, oder auch Prostanoiden genannt, können Entzündungen durch ihre pro- bzw. antiinflammatorische Wirksamkeit steuern [67]. Sie gehören zu den Lipidmediatoren, die aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch die Lipoxygenase und die Cyclooxygenase metabolisiert wurden. Innerhalb der Gruppe der Eicosanoide gibt es vier Substanzgruppen: Die Prostaglandine (PG), Prostacycline (PGI), Thromboxane (Tx) und Leukotriene (LT), die jeweils nochmal in unterschiedliche

„Serien“ eingeteilt werden können [62]. Der Index der Serie gibt die Zahl der Doppelbindungen im Molekül an.

Wichtig für die vorliegende Arbeit sind vor allem die Eicosanoide der Serie-2 und -3.

Serie-1 wird aus Dihomogammalinolensäure (DGLA) metabolisiert und wirkt hemmend auf die Inflammation [77].

Serie-2 entsteht aus der AA und ist der Gegenspieler der Serie-1 und -3. Sie wirken proinflammatorisch [77].

Serie-3 der Eicosanoide wird aus der EPA katalysiert und wirkt wie die Serie-1 antiinflammatorisch [77].

Das zu der Serie-2 gehörende und aus der AA metabolisierte PGE_2 ist das im Körper am meisten produzierte Prostaglandin mit einer Vielzahl von Aufgaben, die über vier Rezeptoren (EP_1 -4, Rezeptor für das Prostaglandin E) vermittelt werden [78]. AA wird von der Cyclooxygenase (COX-2) zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) katalysiert. PGH_2 wird dann von der PGE Synthase in PGE_2 transformiert. Dieser Schritt kann durch drei unterschiedliche PGE Synthesen katalysiert werden. Zum einen gibt es die sich im Zytosol befindende PGE Synthase (cPGE) und zum anderen zwei membrangebundene Synthesen (mPGE-1, mPGE-2). mPGE-1 gehört zu den membranassoziierten Proteinen, die beim Eicosanoid-Metabolismus mitwirken. PGE_2 spielt in der normalen Physiologie und der Pathologie eine wichtige Rolle. Zu den biologischen Wirkungen zählen die Entzündungen, Schmerz, Tumorgenese, vaskuläre Regulation, neuronale Funktion, weibliche Reproduktion, Darmschleimhautprotektion und die Nierenfunktion [78].

Ein weiteres Produkt, das aus der AA entsteht, ist PGI_2 . Es wird von Endothelzellen durch die COX-2 und Prostacyclinsynthase gebildet. Seine Wirkung auf glatte Muskelzellen wird über einen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor vermittelt. Die Stimulation des Rezeptors führt zu einer Erhöhung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) im Zytoplasma, wodurch eine Dilatation der glatten Muskelzellen bewirkt wird [79].

Weitere Metabolite der AA sind PGH_2 und PGG_2 . Diese labilen Zwischenstufen werden in stabile bzw. instabile Prostaglandine transformiert. Das instabile Prostaglandin wird auch durch die Thromboxansynthase in TxA_2 metabolisiert. TxA_2 führt zu einer schnellen und irreversiblen Plättchenaggregation. Es ist bei der Leukozytenaggregation, der Vasokonstriktion, der Bronchokonstriktion und der Leukozytenadhäsion an das Endothelium wichtig. Zudem spielt es eine zentrale Rolle in der Entwicklung eines

Lungenversagens. Die progressive Broncho- und Vasokonstriktion führen zu einer schlechten Compliance und zu einem Ventilations-Perfusions-Mismatch mit nachfolgender Hypoxie [62, 80].

Weitere Produkte, die aus der AA und durch die Lipoxygenase entstehen, sind die Leukotriene. Durch enzymatische Dehydratisierung von 5-HPETE entsteht das labile Epoxid, Leukotrien A₄. Aus LTA₄ entsteht zum einen durch eine enzymatische Hydrolysierung das LTB₄, und zum anderen entstehen die Cysteinylleukotriene. LTB₄ ist eine der aktivsten Komponenten, die aus der AA entstehen und ist ein potenter Mediator für die Leukozyten, indem es sie aktiviert und zum Entzündungsgeschehen lockt [80]. LTC₄, LTD₄ und LTE₄ gehören zur Gruppe der Cysteinylleukotriene und werden aus der AA ebenso über das LTA₄ metabolisiert. Sie regulieren den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität und können damit ein pulmonales Ödem auslösen [62].

Die Eicosanoide der Serie-3 werden aus der EPA katalysiert und wirken wie die Serie-1 antiinflammatorisch [77].

Wird die AA in den Membranphospholipiden durch die EPA ersetzt, werden durch die Cyclooxygenase und die Lipoxygenase über mehrere Zwischenstufen PGE₃, PGI₃, TxA₃ und LTB₅ metabolisiert [81]. Sie haben eine geringere biologische Aktivität als die Metabolite der AA [62, 82] und wirken teilweise antagonistisch zu den Eicosanoiden der AA [83].

In einer Studie von *Shapiro et al.* wurde gezeigt, dass Eicosanoide, besonders PGE₃ und LTB₅, einen hemmenden Effekt auf die Lymphozytenproliferation haben [75].

Aus der EPA entsteht außerdem TxA₃, das im Gegensatz zum TxA₂ nur eine schwache Wirkung der Plättchenaggregation und Vasokonstriktion aufweist [63].

PGI₃, ebenfalls ein Produkt aus der EPA, ist wie PGI₂ ein aktiver Vasodilatator und Hemmer der Plättchenaggregation [63].

LTB₅ wird nach Verzehr von Fisch oder Fischöl vermehrt gebildet und ist ein schwacher Chemoattraktant und entzündungsauslösender Faktor [63].

In Versuchen wurde gezeigt, dass es in Thrombozyten bei Vorhandensein von EPA und AA zu einer Konkurrenz um die Metabolisierung durch die Cyclooxygenase kommt. Es konnte demonstriert werden, dass EPA das bevorzugte Substrat war und es dadurch zu einer vermehrten Metabolisierung zu TxA₃ kam [84].

Das Verhältnis der ω -6 und ω -3 Fettsäuren in den Membranphospholipiden der Zellmembranen hat somit einen bedeutenden Einfluss auf die Metabolisierung der pro- und antiinflammatorisch wirkenden Eicosanoide und auf die weitere Signaltransduktion im Verlauf einer Entzündungsreaktion [63].

2.4.4 Resolvine

Resolvine sind neben der Serie-3 Prostanoiden und der Serie-5 Leukotriene von ω -3 Fettsäuren abgeleitete Mediatoren. Sie wurden erst in den letzten Jahren von der Gruppe um *Charles Serhan* entdeckt [85]. Der Name leitet sich von den Produkten, die die Auflösung der Entzündungsreaktion bewirken, ab: *resolution phase interaction products*. Sie haben sich als wirksamer Regulator der Leukozyten und Entzündungsantwort *in vivo* gezeigt [76].

Die Resolvine werden in unterschiedliche Gruppen eingeteilt, je nachdem, von welchem Lipid sie abstammen. Resolvine der E-Serie leiten sich von der EPA ab, Resolvine der D-Serie stammen von der DHA ab [86].

Bei den Resolvinen der E-Serie gibt es fünf unterschiedliche Untergruppen, E1 bis E5. Diese entstehen aus EPA mittels zweifacher Oxygenierung. Zunächst wird EPA in Endothelzellen durch Cyclooxygenase (COX)-2 oxygeniert. Das daraus entstandene Produkt 18R-hydro(peroxy)-EPA wird mittels der 5-Lipoxygenase (LOX) zu 5S-hydro(peroxy), 18R-hydroxy-EPA in Leukozyten weiter oxidiert. Durch diese erneute zweite Oxidation durch die 5-LOX entsteht das Resolvin E1 und in der Folge E2-5 [87, 88].

Resolvin D1 bis D4 und das Neuroprotektin D1 entstehen aus der DHA. Sie werden entweder in den Endothelzellen durch die 15-Lipoxygenase oder die COX-2 zu 17H(p)-DHA, 17S-H(p)-DHA oxidiert, aus denen durch die in den Leukozyten enthaltene 5-Lipoxygenase 4S- oder 7S-Hydroperoxy, 17S/R-DHA und in der Folge die Resolvine D1 bis D4 entstehen. Durch eine Epoxidation von 17S-H(p)-DHA zu 10,17S-dihydroxy-Docosatriene entsteht Neuroprotektin D1. Neuroprotektine sind 10R,17S-Docosatriene. Sie heißen Neuroprotektine, da man zunächst herausgefunden hat, dass sie in den Gliazellen des Gehirns gebildet werden, in denen sich reichlich DHA befindet [76, 88-90].

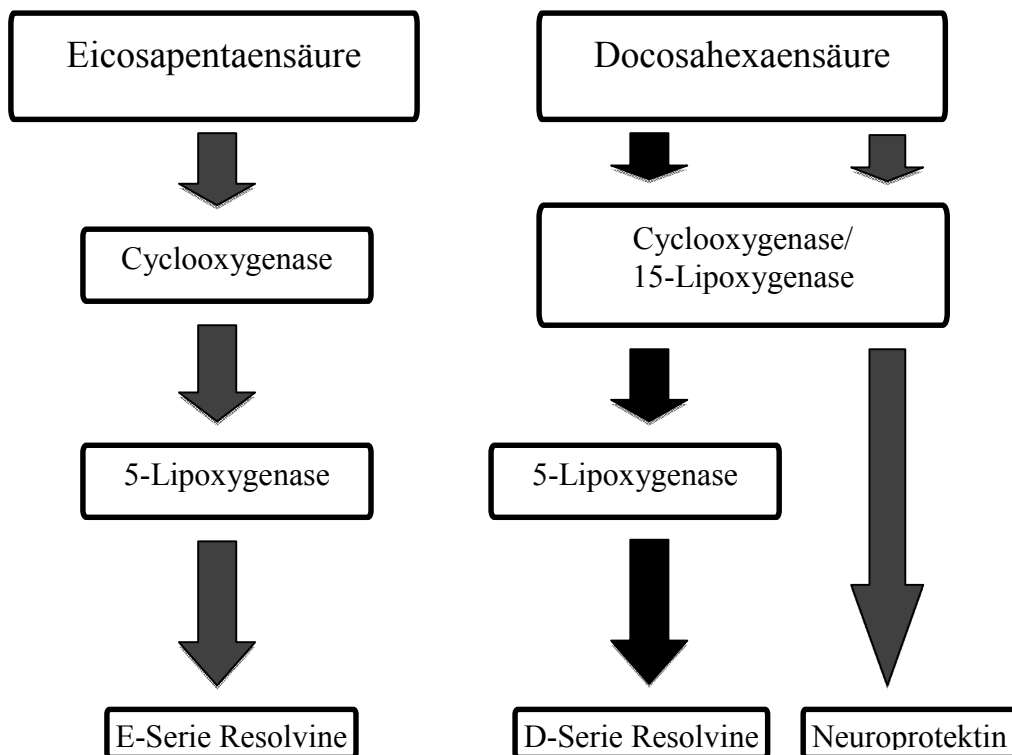


Abbildung 8: Abstrakte Darstellung der Synthese der Resolvine

Aus der Eicosapentaensäure entstehen durch Metabolisierung über die COX und die LOX die Resolvine der E-Serie. Die Resolvine der D-Serie werden über die Docosahexaensäure synthetisiert, so wie die Neuroprotektine.

Man kennt zwei Rezeptoren, über die die Resolvine, insbesondere RvE1, ihre Aktivität ausführen. Der eine ist der G-Protein-gekoppelte Chemokin-Rezeptor 23 (ChemR23), der sich auf Monozyten und dendritischen Zellen befindet. Der andere ist der auf neutrophilen Granulozyten sitzende Leukotrien B₄ Rezeptor 1 (BLT1) [87].

In Abbildung 9 ist zu sehen, wie aus der EPA und einer durch Aspirin-getriggerten COX-2 Resolvine der E-Serie entstehen, die mit dem ChemR23 der Leukozyten reagieren und so Einfluss auf den weiteren Verlauf der Entzündung nehmen können. Sie unterstützen den Rückgang der Inflammation, indem sie die Leukozytenaktivität, die Extravasation und die NF-κB Aktivität verringern [91].

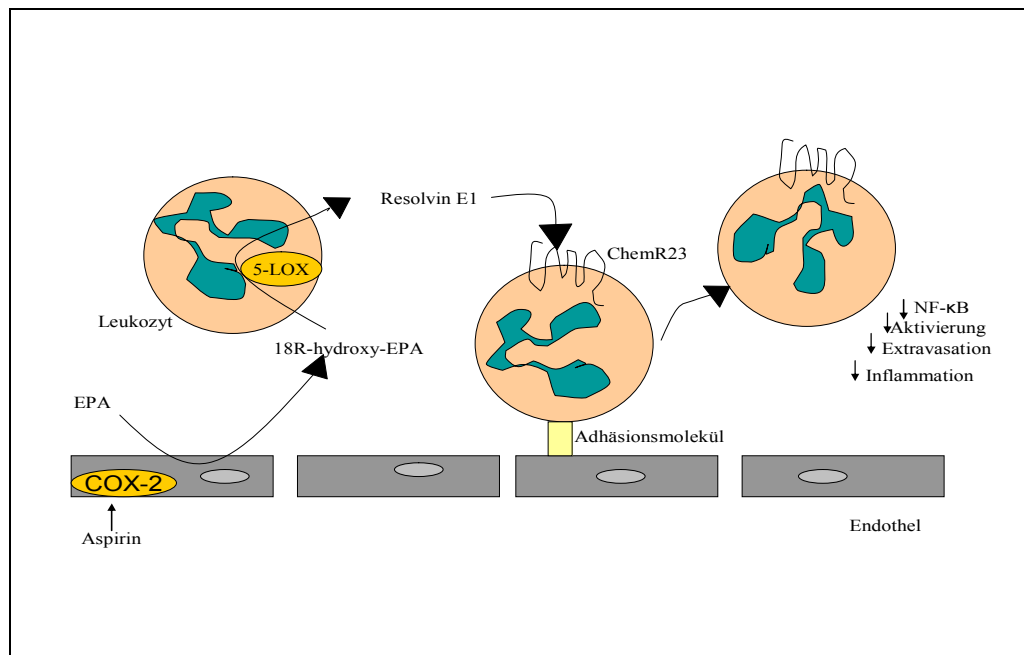


Abbildung 9: Resolvin E1 und sein Rezeptor

Die Synthese von Resolvin E1 geschieht über die in Endothelzellen vorhandene COX-2 und die 5-Lipoxygenase in Leukozyten. Aspirin inaktiviert COX-2, gewährt jedoch die Bildung von 18R-hydroxy-EPA, welche in Leukozyten über 5-LOX in Resolvin E1 umgewandelt wird. Dieses Lipid kann dann über einen parakrinen oder autokrinen Weg auf den ChemR23, einen sieben G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wirken. So kommt es zu einer verminderten Leukozytenaktivität mit reduzierter Synthese und Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren. [91]

Bisher konnte das Auftreten der Resolvine mit einer schnelleren Auflösung inflammatorischer Aktivität im Tierversuch und die aktive Beendigung der Entzündung durch Applikation synthetischer Resolvine nachgewiesen werden [85, 89, 92].

Auch andere Studien zeigten, dass Resolvine die Transmigration der Leukozyten ins entzündete Gewebe verringerten und die Apoptose der Granulozyten im Gewebe, die Phagozytose der Makrophagen und den lymphatischen Abtransport der Phagozyten steigerten [87, 93].

In weiteren *in vivo* Versuchen wurde gezeigt, dass Resolvine der D-Serie eine Hemmung der TNF- α induzierten IL-1 β Transkription und eine Einschränkung der Leukozyteninfiltration in die Haut, ins Gehirn und bei Peritonitis bewirken [76]. Es wurde gezeigt, dass Neuroprotektin D1 eine Hemmung der Leukozyteninfiltration und der proinflammatorischen Genexpression (NF- κ B) bewirkt [90].

2.4.5 Anwendungen und Erfahrungen mit Lipiden in der Klinik

Fettsäuren werden von allen Zellen des Körpers u.a. zum Aufbau der Zellmembran benötigt. Die ungesättigten Fettsäuren bewirken eine hohe Fluidität der Zellmembranen. Ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren dagegen bewirkt einen Verlust an Elastizität und Fluidität der Zellmembranen. Außerdem dienen die Fettsäuren aufgrund ihrer Energiedichte dem Körper als Hauptenergielieferant [72].

Die Fette, die täglich mit der Nahrung oral aufgenommen werden, werden normalerweise zu 95% im Dünndarm resorbiert. Durch Lipasen, die in Zungengrunddrüsen und im Pankreas gebildet werden, werden die Fette der Nahrung gespalten. Die Triglyceride werden im Magen-Darm-Trakt zu freien Fettsäuren und 2-Monoglyceriden (das sind Glycerinmoleküle mit einer gebundenen Fettsäure) zerlegt. Die enzymatisch aufgespaltenen Nahrungsfette können nun absorbiert werden. Aus den Fettsäuren und Monoglyceriden bilden sich Mizellen, die durch die Zellmembran in die Enterozyten diffundieren können. Die kurzkettigen Fettsäuren sind gut wasserlöslich und können so direkt über das Kapillarsystem in den Pfortaderkreislauf gelangen. Dort werden sie an das Transportprotein Albumin gebunden und in Körperzellen transportiert. Die langkettigen Fettsäuren können die Zellwände nicht passieren und werden im endoplasmatischen Retikulum der Enterozyten durch Veresterung in Triglyceride umgewandelt, und können als Chylomikronen in die Lymphbahn abgegeben werden, die Blutbahn erreichen und dem Körper zur Verfügung stehen [72, 94].

Intensivpflichtige Patienten werden teilweise mit Lipidemulsionen ernährt, um ihren Energiehaushalt im Falle einer schweren Krankheit und/oder künstlicher Beatmung zu gewährleisten. Standardmäßig wird in der westlichen Ernährung und in dem aktuellen Nährstoffangebot auf Intensivstationen eine ω -6 reiche Lipidemulsion mit dem Inhaltsstoff Linolsäure verwendet. Dabei kommt es zur Freisetzung von Arachidonsäure oder ihrer Vorstufen aus den infundierten Fetten, z.B. γ -Linolensäure, die den Enzymsystemen zur Verfügung stehen [63, 83]. Im Fall einer akuten Lungenschädigung (ARDS) kommt es durch die metabolisierten Lipidmediatoren zu einer Verstärkung der inflammatorischen Prozesse in der Lunge. In diese Gruppe gehören die bereits oben erwähnten, von der COX-2 abgeleiteten Prostaglandine und Thromboxane und die von der Lipxygenase abgeleiteten Leukotriene [95].

Verschiedene Arbeitsgruppen haben berichtet, dass die Ernährung, inklusive der ω -3 Fettsäuren, einen großen Einfluss auf die Krankheitshäufigkeit von ARDS bei Intensivpatienten hat. Leidet ein Patient an einer akuten Lungenschädigung, führt eine spezielle Ernährung mit Eicosapentaensäure, Linolensäure und Antioxidantien zu einer verbesserten Oxygenierung des gesamten Organismus [96, 97]. Zusammenfassend konnte in den Studien gezeigt werden, dass ω -3 Fettsäuren nicht nur für die Kalorienzufuhr wichtig sind, sondern auch immunologische Aktivität besitzen [61].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von ω -3 versus ω -6 Fettsäuren bei akuter Lungenschädigung im Mausmodell untersucht. Eingesetzt wurden Fat-1 Mäuse, die eigenständig ω -6 Fettsäuren in ω -3 Fettsäuren mit Hilfe einer Desaturase umwandeln konnten. Die Mäuse wurden mit unveränderten Wildtyp Mäusen verglichen. Das Ziel war es, Unterschiede der Entzündungsantwort bei einer akuten Lungenschädigung bei unterschiedlichen ω -6/ ω -3 Verhältnissen zu erforschen.

2.5 Fat-1 Mäuse

Für die Versuche wurden transgene Mäuse eingesetzt. Es handelt sich hierbei um transgen veränderte Mäuse, denen das ω -3 Desaturase Gen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans* mittels Adenovirustransfektion in das Genom eingebracht wurde. Somit sind sie in der Lage, mit Hilfe einer ω -3 Fettsäuredesaturase eigenständig ω -6 in ω -3 Fettsäuren umzuwandeln, und können dann ω -3 Fettsäuren in Zellmembranen einbauen. Fat-1 Mäuse zeigen ein zu den Wildtyp Mäusen verändertes ω -6/ ω -3 Verhältnis im Blut auf [98, 99].

2.6 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Zusammenhänge beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit pro- und antiinflammatorischen Wirkungen von ω -6 und ω -3 Fettsäuren auf eine akute Lungenschädigung im Mausmodell. Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Hinweise auf die positiven und negativen Wirkungen der einzelnen Fettsäurefamilien bei Lungenschädigung zu gewinnen und zu untersuchen, welchen Einfluss unterschiedliche ω -6/ ω -3 Fettsäureverhältnisse auf ein Entzündungsgeschehen haben. Folgende Fragestellungen sollten hierbei untersucht werden:

- 1) Hat das ω -6/ ω -3 Verhältnis bei akuter Lungenschädigung in WT und Fat-1 Mäusen unterschiedliche Auswirkungen auf die Leukozytenmigration in die Lunge und auf die Anzahl aktivierter Leukozyten in der Lunge?
- 2) Gibt es Unterschiede in den zwei Mausgruppen hinsichtlich der Gefäßpermeabilität in der Lunge bei einer akuten Lungenschädigung?
- 3) Unterliegt die Synthese der proinflammatorischen Zytokine bei einer akuten Lungenschädigung in Mäusen mit einem unterschiedlichen Verhältnis von ω -6 und ω -3 Fettsäuren einer Beeinflussung durch das ω -6/ ω -3 Verhältnis?
- 4) Wie unterscheiden sich die motorische Aktivität und die Körpertemperatur der beiden Mausgruppen bei einer akuten Lungenschädigung?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere standen Mäuse zwei verschiedener Versuchslinien zur Verfügung. Zum einen wurden C57/Bl6J Tiere untersucht. Mäuse der Inzuchtlinie stammten von Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland. Die Fat-1 Mauslinie wurde von Prof. Jing X. Kang, Boston, Massachusetts, USA, zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden 12-16 Wochen alte Mäuse verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug 23-25g.

Die Haltung der Mäuse erfolgte entsprechend artgerechter Haltung in transparenten Polycarbonatkäfigen unter pathogenfreien Bedingungen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter (ssniff R/M-H) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Das ω -6/ ω -3 Verhältnis der Fettsäuren in der Ernährung betrug 7,3/1. Die Jungtiere wurden im Alter von vier Wochen abgesetzt, geschlechtlich getrennt und in Gruppen zu maximal fünf Mäusen aufgezogen.

3.2 Material

3.2.1 Experimentelle Agenzien und Pharmaka

Narkosemittel

Ketavet 100mg/ml; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland

Rompun 2%; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Infektionsstimulus

Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli (Serotyp 0111:B4); Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Lungenhistologie

Formaldehyd, säurefrei; Roth, Karlsruhe, Deutschland

PBS (isotonische Pufferlösung (pH 7,4) aus NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Aqua dest.)

Ethanol (70%, 96%, 99,6%); Fischer, Saarbrücken, Deutschland

Isopropanol (99,8%); Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Xylol; Roth, Karlsruhe, Deutschland

Rotihistol; Roth, Karlsruhe, Deutschland

Hämalaun nach Mayer und Sauer; Chroma, Münster, Deutschland

Shandon Eosin Y, alkoholisch; Thermo Electron Corporation, Waltham, USA

BAL-Lösung

400ml PBS (isotonische Pufferlösung (pH 7,4) aus NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Aqua dest.)

100ml EDTA 1%; Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Zellzählung (Cytospin)

May-Grünwald Färbung; Merck, Darmstadt, Deutschland

Giemsa Färbung; Merck, Darmstadt, Deutschland

Myeloperoxidase (MPO)

HTAB Puffer; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Lösung A: KH_2PO_4 ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Lösung B: K_2HPO_4 ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

o-Dianisidin Lösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Proteinbestimmung

BioRad DC Protein Assay; BioRad, Bad Nauheim, Deutschland

1,42mg/ml BSA; PAA Laboratories, Pasching, Österreich

ELISA

TNF- α Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

MIP-2 Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate (HRP); Zymed, San Francisco, USA

Substrat Reagenz Pack, Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

H₂SO₄ (1M); Merck, Darmstadt, Deutschland

Fettsäureanalyse

Chloroform p.a.; Merck, Darmstadt, Deutschland

Chloroform Uvasol; Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol p.a.; Fluka, Buchs, Schweiz

Methanol reinst; Fluka, Buchs, Schweiz

Hexan p.a.; Fluka, Buchs, Schweiz

Aceton p.a.; Merck, Darmstadt, Deutschland

Diethylether; Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland

Ameisensäure; Merck, Darmstadt, Deutschland

Primulin; Sigma, Steinheim, Deutschland

Fettsäure (FA) & Fettsäuremethylester (FAME) Standards; Sigma, Steinheim, Deutschland

3.2.2 Geräte

Chirurgisches Besteck

Scheren, Pinzetten, Nadelhalter; Rebstock Instruments GmbH, Dürbheim, Deutschland

Operationsmikroskop

Stereolupe Leica MS 5; Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland

Zentrifugen

Hettich Rotanta/AP; Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Cytospin 3; Shandon, Frankfurt am Main, Deutschland

Geräte für die Lungenhistologie

Digitale Kamera (DC 300 F); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Heizplatte (EG 1120); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Kühlplatte (EG 1150 C); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation (EG 1140 H); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad (HI 1210); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom, vollautomatisch; Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop, Durchlicht (DMLA); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Vakuumgewebefixationsautomat (TP 1050); Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank; Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland

Leukozytenzählung

Neubauer Zählkammer; Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland

Mikroskop

Dialux Mikroskop; Olympus, Wiesbaden–Delkheim, Deutschland

Homogenisator

Ultra–Turrax T8; Ika–Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Dispergierwerkzeug klein, Durchmesser: 5mm

ELISA–Reader

SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland

Wärmeschrank

Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland

Klimakammer

Typ 10'US/+5 to +40 DU; Fa. Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen-Lindenstruth, Deutschland

Radioreceiver

RA 1000; Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, Oregon, USA

Software der Aktivitäts- und Temperaturmessung

Vital View Data Acquisition System; St. Paul, Minnesota, USA

Gaschromatograph und Zubehör

Chrompack CP 9000; Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland

Autosampler Modell 910; Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland

Kapillarsäule (CP-Sil 88, 50m × 0,25mm ID); Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland

Aktivkohle-, Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter; Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland

Software: Maitre Version 2.5; Varian Chrompack, Darmstadt, Deutschland

Varifuge 3.OR; Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland

Camag Linomat IV Applikator; Camag, Muttenz, Schweiz

VLM EC2 Heizblock; VLM, Leopoldshöhe, Deutschland

3.2.3 Zusätzliche Materialien

Mäuse

C57/Bl6J; Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Fat-1 Mäuse; Prof. Kang, Boston, Massachusetts, USA

Käfige

Makrolon, Typ II L; Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Tiereinstreu

Altromin Tierstreu-Granulat; Altromin GmbH & Co. KG, Lange-Lippe, Deutschland

Tierfutter

Ssniff R/M-H, Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse-Haltung; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

Desinfizierende Lösung

Braunoderm; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Venenverweilkatheter

Vasocan Braunüle 22G; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Vasocan Braunüle 20G; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Augensalbe

Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5g; Roche, Eppstein–Bremthal, Deutschland

Blutentnahmesystem

Blutentnahmesystem mit Citrat beschichtet; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

BD Microlance 3, 26G Kanülen; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Nahtmaterial

Ethicon Prolene 6-0, monofil mit atraumatischer Nadel; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

Objektträger mit Rand

R. Langenbrinck; Teningen, Deutschland

96-well Elisa-Platte

Nunc-immuno plate; Nunc, Roskilde, Dänemark

Röhrchen

13ml Röhrchen, Polystyrol; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Transmitter für Temperatur- und Aktivitätsmessung

XM-FH-Transmitter; Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, Oregon, USA

Paraffin

Paraffin/Elvax Coating Kits; med-Natic, München, Deutschland

Verbrauchsmaterialien für Lungenhistologie

Einmalhandschuhe; Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland

Einmalspritze, 1ml, 20ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Greiner Tubes, 15ml; Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Heidelberger Verlängerung; M. Schilling GmbH, Gelnhausen-Hailer, Deutschland
Kanüle, 26G ½; Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mulltupfer, pflaumengross; Beese, Barbüttel, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5ml; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Venenverweilkanüle, 20G; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Deckgläser, 24x36mm; R. Langenbrinck, Emmerdingen, Deutschland
Einbettkassetten mit Deckel; Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Eindeckmedium, Xylol-löslich (Pertex^R); Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Mikrotomklingen S35; Feather, Japan (über Produkte für die Medizin AG, Köln)
Objektträger (Super Frost Plus^R); R. Langenbrinck, Emmerdingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus^R); R. Langenbrinck, Emmerdingen, Deutschland

Dünnschichtchromatographie

DC-Platten Kieselgel 60 20×20cm; Merck, Darmstadt, Deutschland
Filterpapier 20×20cm; Camag, Muttensz, Schweiz
3ml PTFE frits for refill; Bakerbond SPE, Deventer, Holland
DC-Trennkammer; Camag, Muttensz, Schweiz
Vakuumkammer; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
1,1ml Glasvials mit Spitzboden; VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Teflon Septen; Abimed, Langenfeld, Deutschland

Gase

Stickstoff 5.0; Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Wasserstoff 5.0; Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Synthetische Luft 20,5% O₂ in N₂; Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Sauerstoff AL; Air liquid Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland

3.2.4. Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Myeloperoxidase

MPO Puffer: Lösung A: 6,8g KH₂PO₄ in 1000ml dH₂O

Lösung B: 8,7g K_2HPO_4 in 1000ml dH_2O

22ml Lösung B + 178ml Lösung A

HTAB Puffer: 5g HTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) in 1000ml MPO Puffer

o-Dianisidin Lösung: 0,0167g o-d HCl + 90ml dH_2O + 10ml MPO Puffer + 50 μ l 1% H_2O_2

Proteinbestimmung

BioRad DC Protein Assay; BioRad, Bad Nauheim, Deutschland

Lösung A: 1ml Reagenz A + 20 μ l Reagenz S

ELISA

Waschpuffer: 1000ml Aqua dest.

2,4g 20mM TRIS; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

0,5ml Tween 20 (Polyoxyethylene–Sorbitan Monolaureate); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

pH: 7,3

Blockpuffer: 100ml PBS 1 \times

1g Bovine Serum Albumin; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

5g Saccharose; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

0,05g NaN_3 ; Merck, Darmstadt, Deutschland

Diluent: 200ml Aqua dest.

0,2g BSA; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

0,1ml Tween 20; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

0,48g TRIS Base; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

1,75g NaCl; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

pH: 7,3

3.3 Methoden

3.3.1 Anästhesie

Eine intraperitoneale Injektionsnarkose wurde bei allen Eingriffen durchgeführt. Hierfür wurde eine Spritze mit zwei Anteilen NaCl-Lösung (200µl), einem Anteil Ketavet 10% (100µl) und einem Anteil Rompun 2% (100µl) aufgezogen. Die Maus wurde mit einer Hand fixiert und die Narkose ventral paramedian abdominal injiziert. Die Tiere erhielten je nach Vorhaben 70-100µl der Mischung.

3.3.2 Intratracheale LPS-Instillation

Ein Endotoxin, hier das LPS von *E. coli*, wurde der Maus in die Lunge instilliert. Für die LPS-Instillation wurde die Maus in Narkose gelegt und so platziert, dass man einen guten Einblick in die Maulhöhle bekam. Unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Mikroskops wurde ein Katheter (Vasocan Braunüle, 22G) via Maulhöhle an den Stimmbändern vorbei in die Trachea eingeführt. Ein Gesamtvolumen von 50µl, bestehend aus 10µg LPS verdünnt in NaCl, wurde langsam, auf zwei bis drei Portionen aufgeteilt, in die Lunge eingegeben. Der Katheter wurde anschließend mit ca. 150µl Luft durchspült und aus der Trachea entfernt.

3.3.3 Lungenhistologie

3.3.3.1 Organentnahme

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Narkosemittel euthanasiert und die Lunge vorsichtig entnommen. Hierfür wurde zunächst der ventrale Halsbereich, der Thorax und das kraniale Abdomen mit Braunoderm desinfiziert und dann ein Hautschnitt gesetzt. Das Abdomen wurde eröffnet, der Processus Xiphoideus mit einer Pinzette gehalten und das Diaphragma mit einer Präparierschere vorsichtig durchtrennt. Das Sternum wurde median gespalten, die Rippenbögen wurden auseinander gespreizt und

seitlich fixiert. Die Trachea wurde frei präpariert indem die subkutan liegenden Glandulae mandibulares median stumpf getrennt und der M. trachealis durchtrennt wurde. Die Trachea wurde zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet und ein Katheter für die spätere Fixierung der Lunge eingeführt. Zur Spülung der Lunge wurde über den rechten Ventrikel mit Hilfe einer Kanüle NaCl als Spüllösung verabreicht, die durch einen Schnitt im linken Ventrikel abfließen konnte.

3.3.3.2 Fixierung der Lunge

Nach der Spülung der Lunge erfolgte die Fixierung für die histologische Aufarbeitung. Nach Öffnung der Trachea wurde über eine Braunüle eine 4,5% Formaldehydlösung mit einem Druck von 20cm Wassersäule in die Lunge gefüllt. Die Trachea wurde unterhalb der Inzision ligiert, die Lunge vorsichtig heraus präpariert und in ein, mit 4,5% Formaldehydlösung gefülltes, 50ml Falcon-cup gegeben. Die Lunge wurde 24h bei 4°C gelagert und danach in eine Einbettkassette mit PBS überführt. Darin lagerte sie bis zur Entwässerung bei 4°C.

3.3.3.3 Entwässerung und Paraffin-Einbettung

Die Gewebestücke wurden mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 99,6%, Isopropanol 99,8%) entwässert und anschließend in Paraffin eingegossen.

3.3.3.4 Schnitttechnik

Mit Hilfe eines vollautomatischen Rotationsmikrotoms wurden von den Paraplastblöcken 3µm große Einzelschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem handwarmen Wasserbad mit einem Pinsel gestreckt und auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger über Nacht in einen 37°C warmen Wärmeschrank gelegt.

3.3.3.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die 3µm dicken Gewebeschnitte wurden mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung gefärbt. Bei dieser Färbemethode werden Zellkerne blau und cytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot gefärbt.

Zunächst mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurden die Schnitte für 20min in einen 60°C warmen Brutschrank gelegt und dann dreimal 10min in Rotihistol getaucht. Zur Rehydrierung kamen die Schnitte in eine absteigende Ethanolreihe: Zweimal 5min in 99,6% Ethanol und jeweils 5min in 96% und 70%iges Ethanol. Anschließend wurden sie 2min mit destilliertem Wasser gespült. Nun konnte die Kernfärbung erfolgen. Hierzu kamen die Objektträger für 20min in Hämalaun nach Mayer und Sauer, und wurden anschließend unter fließendem Wasser für 5min gespült und 1min in 96% Ethanol getaucht. Dann wurde für 4min die Plasmafärbung mit Shandon Eosin Y, alkoholisch, durchgeführt und anschließend wieder mit destilliertem Wasser gespült. Nun erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (zweimal 2min 96% Ethanol, 5min 99,6% Ethanol und 5min Isopropanol 99,8%) sowie zweimal 5min Rotihistol. Die Schnitte wurden mit Xylol behandelt, mit Pertex betropft und mit Deckgläsern abgedeckt.

3.3.4 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die euthanasierte Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert und die Trachea wie in 3.3.3.1 beschrieben frei präpariert und eröffnet. In die Öffnung zwischen zwei Knorpelspangen wurde der Teflonschlauch einer Vasocan Braunüle, 20G, in die Trachea eingeführt und fixiert. Mit einem kalten Gemisch aus PBS und EDTA wurde die Lunge gespült. Beim ersten Spülgang wurde, um die Lunge vorsichtig zu weiten, ein Volumen von 200µl verwendet. Alle weiteren Spülungen hatten ein Volumen von ca. 350µl, bis ein 1,5ml fassendes Eppendorf-Cup gefüllt war.

Das Cup wurde bei 1200rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20°C eingefroren.

3.3.5 Zellzählung

Nachdem die Lunge lavagiert, die Flüssigkeit zentrifugiert und der Überstand abpipettiert waren, wurde das Zellpellet in 1ml 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Eine Neubauerzählkammer wurde mit 10µl dieser Lösung beschickt und die Zellen unter einem Mikroskop gezählt. Für die Gesamtzahl wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt. Das so ermittelte Ergebnis, multipliziert mit vier (vier Großquadrate), zweieinhalb (die Höhe des Volumens in der Kammer) und 1000 (gelöst in 1000µl NaCl) entsprach der Zellzahl an Leukozyten in der BAL.

3.3.5.1 Differenzierung der Leukozyten in der BAL

Um einen prozentualen Überblick der verschiedenen Leukozyten-Populationen in der Lavage zu erhalten, wurden die Leukozyten mittels einer Zentrifuge vom Typ Cytospin 3 (5min, 5000rpm) auf einen Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Zellen mit einer Pappenheim-Färbung (May-Grünwald-Giemsa) angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.3.6 Auswertung des leukozytären Enzyms Myeloperoxidase (MPO)

3.3.6.1 Organentnahme

Nach dem Tod des Tieres wurde die Lunge lavagiert und dann zur weiteren Analyse komplett entnommen. So konnte die Anzahl der interstitiellen und intravaskulären Leukozyten in der Lunge mit Hilfe des MPO Tests gemessen werden.

Die Lunge wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei – 20°C gelagert.

3.3.6.2 Myeloperoxidase (MPO) Aktivitäts-Assay

Zu Beginn des Assays wurde die gefrorene Lunge auf Eis aufgetaut und das Gewicht bestimmt. Zu je 50mg Lunge wurde 1ml HTAB-Puffer gegeben. Anschließend wurde

die Lunge mit einem Homogenisator für ca. 15sec. zerkleinert und mittels einer Pipette mit dem HTAB-Puffer gut vermischt. Diese Vorgänge fanden auf Eis statt. 1ml der Probe wurde in ein Reaktionsgefäß gefüllt und bei 4°C für 4min und 3500rpm zentrifugiert. 7µl des Überstandes und 200µl der o-Dianisidin Lösung wurden in eine Öffnung einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Aufgrund der Reaktion der Sauerstoffradikalen aus den Leukozyten mit der o-Dianisidin Lösung kam es zu einem Farbumschlag, welcher mittels einer kinetischen Messung bei 450nm gemessen wurde. Der so erhaltene mOD-Wert/min wurde mit 0,2528 multipliziert, um die MPO-Werte/mg Gewebe zu erhalten [100]. Zur Erstellung der Tabelle wurden die Werte in MPO-Werte/g Gewebe umgerechnet [101].

3.3.7 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in den Lungenalveolen wurde in der Lavageflüssigkeit bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte entsprechend des BioRad-Protokolls. Als Standard verwendete man einen Bovinen Serumalbumin (BSA) Standard. Die Proben wurden 1:2 verdünnt, d.h. in jede Öffnung einer 96-well Mikrotiterplatte gab man zuerst 2,5µl Aqua dest. und dann 2,5µl der Probe oder des Standards. Auf alle Standards und Proben wurden nun je 25µl der Lösung A gegeben. Um den gewünschten Farbumschlag zu erhalten, wurden nun 200µl der Lösung B hinzu pipettiert, und die gesamte Mikrotiterplatte wurde für drei Minuten abgedunkelt geschüttelt. Mittels eines ELISA Readers wurden die Proben bei 550nm photometrisch gemessen.

3.3.8 ELISA (TNF- α , MIP-2)

Die 96-well Mikrotiterplatten wurden zu Beginn mit 100µl des *Capture-Antibodys* (Erst-Antikörper) beschichtet und über Nacht abgedeckt bei Raumtemperatur stehen gelassen, so dass der Antikörper sich am Boden der Platte anhaften konnte. Je nach Versuch verwendete man goat anti-mouse TNF- α bzw. rat anti-mouse MIP-2. Am folgenden Tag wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Mit jeweils 300µl Blockingpuffer pro Öffnung wurden die unspezifischen Bindungen geblockt. Eine Standard-Verdünnungsreihe wurde nun angesetzt. Hierfür wurde als Lösungsmittel

Diluent, wie oben beschrieben, genommen und die Standards des jeweiligen ELISA Tests. Nach der einstündigen Inkubation der Verdünnungsreihe wurden die Mikrotiterplatten mindestens dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann in jede Öffnung entweder 100µl Standard der Verdünnungsreihe oder 100µl Probe pipettiert. Die Platte blieb für zwei Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur stehen, so dass sich das Antigen an den am Boden haftenden Antikörper binden konnte. Bevor 100µl des bereits verdünnten biotin-markierten *Detection-Antibody*s (Zweit-Antikörper) hinzugefügt wurden, wurden die Platten, um das überschüssige Antigen zu entfernen, wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Platten blieben zwei Stunden zugedeckt bei Raumtemperatur stehen, so dass der Zweit-Antikörper an das Antigen binden konnte. Der Überschuss wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und 100µl HRP (*Horseradish peroxidase*) in die Öffnungen pipettiert und 20min abgedunkelt bei Raumtemperatur stehen gelassen. HRP ist ein Protein mit hoher Affinität zu Biotin. Es hat vier Untereinheiten, die alle an ein Biotinmolekül binden können. Eine Untereinheit bindet an einen biotin-markierten Zielantikörper, im Versuch der Zweit-Antikörper, die anderen Untereinheiten binden an ein enzymkonjugiertes Biotin. HRP bewirkt bei dem Substrat einen Farbumschlag, somit kommt es zu einer Verstärkung der späteren Farbreaktion. Die überzähligen Proteine wurden wieder durch dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer entfernt, 100µl Substrat-Puffer wurde hinzugefügt und 20min im Dunkeln belassen, damit er mit HRP reagieren konnte. Mit 50µl 1M Schwefelsäure wurde die Reaktion abgestoppt und die Endpunkt-Messung mittels eines ELISA Readers bei 450nm vorgenommen.

3.3.9 Temperatur- und Aktivitätsmessung

3.3.9.1 Coaten der Transmitter

Paraffin wurde in ein hitzebeständiges Glas gegeben und bei 60°C im Brutschrank verflüssigt. Die Transmitter wurden in das flüssige Paraffin getaucht und dadurch *gecoatet* (überzogen). Durch den Paraffinüberzug waren die Transmitter gut verschlossen, so dass keine Flüssigkeit eindringen konnte.

3.3.9.2 Operation der Mäuse

Der mit Paraffin überzogene Transmitter wurde in die Bauchhöhle der Maus implantiert. Hierfür wurde die Maus narkotisiert, das Abdomen desinfiziert, rasiert und entlang der Linea alba ein ca. 2cm langer Schnitt durch die Haut und das Peritoneum vollführt. Der Transmitter wurde in das Abdomen hineingelegt, und anschließend wurde die Öffnung mit einer fortlaufenden Naht wieder verschlossen. Die Augen wurden mit einer Augensalbe bedeckt, um das Austrocknen der Augen der narkotisierten Mäuse zu verhindern. Die Mäuse hatten eine Woche Zeit sich von der Operation zu erholen.

3.3.9.3 Eingewöhnungsphase

Die Mäuse wurden eine Woche nach der Operation in die Klimakammer gebracht. Dort verbrachten sie einen Tag, bevor die Messung begann. Somit konnten sich die Mäuse an das neue Klima gewöhnen. Die Klimakammer hatte konstante 30°C Raumtemperatur, 50% Luftfeuchtigkeit und einen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus (7:00-19:00 Uhr und 19:00-7:00 Uhr).

3.3.9.4 Stimulation mit LPS

Nach der Eingewöhnungsphase in der Klimakammer wurde ein Teil der Mäuse mit 10µg LPS in einem Volumen von 50µl i.t. stimuliert. Die Kontrollgruppe erhielt 50µl NaCl i.t.. Für diesen Vorgang wurden die Mäuse ein weiteres Mal narkotisiert. Die LPS- und NaCl-Eingabe erfolgte wie in 3.3.2 beschrieben.

3.3.9.5 Messung der Körpertemperatur und Aktivität

Die Messung begann einen Tag vor der Stimulation und endete drei Tage später. Der in der Bauchhöhle der Maus liegende Transmitter maß alle fünf Minuten die Körpertemperatur der Maus und sendete die Daten an den zugehörigen Computer.

Die Aktivität des Versuchstieres wurde ebenfalls über den Transmitter und einen unter dem Käfig befindlichen Empfänger bestimmt. Mit Hilfe dieses Systems konnte die Position der Maus im Käfig alle fünf Minuten festgestellt werden. Anhand der Anzahl der Positionswechsel wurde die Aktivität bestimmt.

3.3.10 Fettsäureanalyse

3.3.10.1 Blutentnahme

Die Maus wurde narkotisiert und auf dem Rücken liegend fixiert. Die Abdominalhöhle wurde eröffnet und die Vena cava caudalis freigelegt. Aus dieser Vene wurde mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (BD Microlance 3, 26G) 500µl Blut entnommen.

Für die Fettsäureanalyse wurde das Blut in Röhrchen mit 50µl vorgelegtem Citrat gefüllt.

Die Blutröhrchen wurden nach der Entnahme bei 2500rpm für 10 Minuten zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei – 20°C eingefroren.

3.3.10.2 Probenaufbereitung zur Analyse von freien Fettsäuren

1. Methode nach Bligh und Dyer

Die Proben wurden nach der Methode von *Bligh* und *Dyer* aufbereitet. Diese Methode ist für die schnelle Lipidextraktion und Reinigung geeignet. Um die Fette aus den Proben zu lösen, benötigte man ein Verhältnis von 0,8:2:1 (Probe + NaCl : Methanol (MeOH) : Chloroform (CHCl₃)). 100µl Serum wurden zusammen mit 1900µl NaCl 0,9%, 10µg Heptadekansäure und 7,5ml MeOH/CHCl₃ in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Heptadekansäure diente bei der Probenaufbereitung und der Messung als interner Standard. 30min wurden die Röhrchen alle 5min für 20sec. gevortext, d.h. auf einem Vortex Mixer durch schnelle Rotation, ca. 2000rpm, gemischt, und danach bei 2500rpm und 4°C für 10min zentrifugiert.

Den Überstand, der die zu isolierenden Stoffe enthält, überführte man in ein zweites Zentrifugenröhrchen und verwarf das Proteinpellet.

Zur Phasenauftrennung benötigte man ein Verhältnis von 1,8:2:2 (einzelne Komponenten der Probe + NaCl : MeOH : CHCl₃). Zu den gewonnen Plasmalösungen wurden jeweils 2,5ml CHCl₃ und NaCl 0,9% zugegeben. Anschließend wurde die Plasmalösung für 30sec. gevortext, gefolgt von einer Zentrifugation bei 2500rpm, für 10min bei 4°C. Mit einer zweimal mit CHCl₃ gespülten Pasteurpipette wurde die untere Phase in Reagenzgläser überführt und im Stickstoffstrom getrocknet. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) mussten die Proben in 60µl CHCl₃/MeOH (2:1) gelöst werden.

2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die 20cm hohe und 20cm breite Trennkammer wurde eine Stunde vor Beginn ca. 1cm hoch mit Laufmittel, bestehend aus Hexan, Diethylether und Ameisensäure (80/20/2 v/v), befüllt. Für die ausreichende Äquilibration (Sättigung des Gasraumes) wurde die Kammer mit Camag Filterpapier bestückt.

Die Proben wurden mit einem Camag Linomat IV Applikator auf die Kieselgel 60 Platten aufgetragen und diese für ca. 40min in die Trennkammer gestellt.

Nach der Beendigung der Separierung der Fettsäuren wurde die DC-Platte mit Kaltluft trocken gefönt und mit dem nicht-destruktiven Reagenz Primulin (Stock: 1% in Methanol, Spray-Lösung 1:10 mit Aceton verdünnt) besprüht. Die einzelnen Lipidfraktionen wurden so markiert. Es wurden insgesamt sieben Neutrallipide aufgetrennt. Diese Neutrallipide sind: Monoglycerin, Diglycerin, Cholesterol, freie Fettsäuren (FFA), Triglyceride, Fettsäuremethylester und Phospholipide. Jedes Neutrallipid hat seine spezifische Retentionsfraktion, z.B. beträgt die der FFA 0,4. Die FFA-Banden konnten unter der UV-Lampe bei 254nm gesehen und mit einem Bleistift gekennzeichnet werden. Die markierten Gelabschnitte wurden mit einem Messer von der Platte abgetragen und in die zuvor mit Fritten versehenen und zweimal mit CHCl₃ gespülten Glassäulen gegeben. Die Elution erfolgte mit 5×2ml CHCl₃ in Verkochungsgefäßen. Die Proben wurden mit Stickstoff abgeblasen und anschließend in 1ml 2 N HCL/MeOH gelöst und über Nacht (ca. 14-16 Std.) bei 100°C verkocht. Durch das Verkochen mit 2 N HCL/MeOH entstehen Fettsäuremethylester (FAME). Die Probe wird für die folgende Gaschromatographie stabiler und ist nicht schon im Injektor ionisierbar, sondern erst im Flammenionisationsdetektor (FID).

3. Hexanextraktion

Nach der Verkochung und kurzem Abkühlen wurde 1ml Hexan (p.a.) zugegeben und für ca. 20sec. gevortext. Die obere Phase wurde mit Hilfe von Pasteurpipetten, die zuvor zweimal mit Hexan (p.a.) gespült wurden, abgenommen und in Spitzbodenvials überführt. Mit Stickstoff wurden die Proben abgeblasen und anschließend das Lipid in 20µl CHCl_3 (p.a.) gelöst.

4. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie (GC) dient zur spezifischen Auftrennung von Stoffgemischen. Die Auftrennung erfolgt über die unterschiedlichen Siedepunkte der Bestandteile der Probe und über die unterschiedlichen Wechselwirkungen der zu analysierenden Substanzen mit der auf die Analysensubstanz angepassten stationären Phase der Trennsäule.

Ein Gaschromatograph besteht aus drei wesentlichen Bauteilen: dem beheizten 250°C warmen Injektor, der beheizten Trennsäule mit der stationären Phase und dem 300°C heißem Detektor.

Der Injektor wird von Wasserstoff (H_2), dem Trägergas, durchströmt. Dieser wurde zuvor durch Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter geleitet. Die Gase werden durch einen Aktivkohlefilter von organischen Verbindungen gereinigt. Im Injektor befindet sich ein Glasliner mit einer Fritte, an dem die Trennsäule und ein Splitter angeschlossen sind. In diesen Glasliner wird 1µl der Proben gegeben. Die Probe verdampft sofort, geht in die mobile Phase und wird vom Trägergas aufgenommen. Der Splitter trennt die verdampfte Probe im Verhältnis 1:5. Ein Teil geht in die Trennsäule und vier Teile werden verworfen, so dass die Trennsäule nicht überladen wird.

Um die eigentliche Trennsäule vor Verunreinigungen zu schützen, fließen die Proben zuerst durch eine 2,5m lange unpolare deaktivierte Vorsäule und erst dann in die 50m lange polare Trennsäule. Sie hat einen Innendurchmesser von 0,25mm und besteht aus Cyanopropylsilikon überzogen mit Silicagel. Die Säule bildet die stationäre Phase, welche sich in einem 120°C warmen Ofen befindet. Sie wird innerhalb des Laufes auf 220°C geheizt, mit einer Temperaturerhöhung von 3°C/min. Die Temperaturerhöhung verkürzt die Retentionszeiten der Lipide und somit auch die Gesamtmessdauer.

Die eigentliche Messung erfolgt über den FID. Im Detektor ist eine durch Wasserstoff und synthetische Luft gespeiste Flamme. Über der Flamme befindet sich der Kollektor, an dem eine Spannung anliegt, so dass sich ein elektrisches Feld um die Flamme herum

befindet. Alle Substanzen, die die Flamme erreichen, werden thermisch ionisiert. Die dabei entstehenden Elektronen werden durch das elektrische Feld zum Kollektor beschleunigt, prallen gegen den Kollektor und erzeugen einen Strom, der als Peak aufgezeichnet wird. Da dieser sehr schwach ist, wird er durch einen Verstärker verstärkt, und das Signal wird an den Computer weiter geleitet.

Bei den unterschiedlichen Substanzen in einer Probe entstehen - in Abhängigkeit von dem molaren Mengenverhältnis der Einzelstoffe - unterschiedlich viele Ionen und damit Elektronen und somit unterschiedlich hohe Peaks, d.h. die Fläche unter den Peaks korreliert mit den Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$.

Die Identität der einzelnen Inhaltsstoffe erhält man durch Vergleich der Retentionszeiten des zu analysierenden Gemisches mit den Retentionszeiten, die aus der Analyse eines Fettsäure-Standard-Mixes gewonnen werden.

In der Abb. 10 ist der Fettsäure-Standard-Mix zu sehen. Dieser externe Standard wird vor jeder Messreihe mit gemessen. Auf der x-Achse sind die Retentionszeiten der unterschiedlichen Lipide angegeben. Die y-Achse zeigt die Spannung in Volt an, die bei der Ionisierung einer jeden Fettsäure entsteht. Die Zahlen über den Peaks sind die Bezeichnungen der einzelnen Fette. Die Arachidonsäure (20:4) hat z.B. eine spezifische Retentionszeit von 22,84min und einen ihrer Konzentration entsprechend großen Peak.

Um die Konzentration einer Fettsäure zu berechnen, multipliziert man die Fläche unter dem entsprechenden Peak mit einem Responsefaktor. Der Responsefaktor gibt die Empfindlichkeit des Detektors wieder. Über den internen Standard gelangt man zur Gesamtmenge, d.h. man hat bei jeder Probenvorbereitung und Messung ca. 30% Verlust an Material. Um den genauen Verlust bestimmen zu können, enthält jede Probe einen internen Standard. Der Verlust, der bei dem internen Standard bestimmbar ist, wird zu der gemessenen Probe hinzu gerechnet. So gelangt man zur Gesamtmenge an FFA in einer Probe.

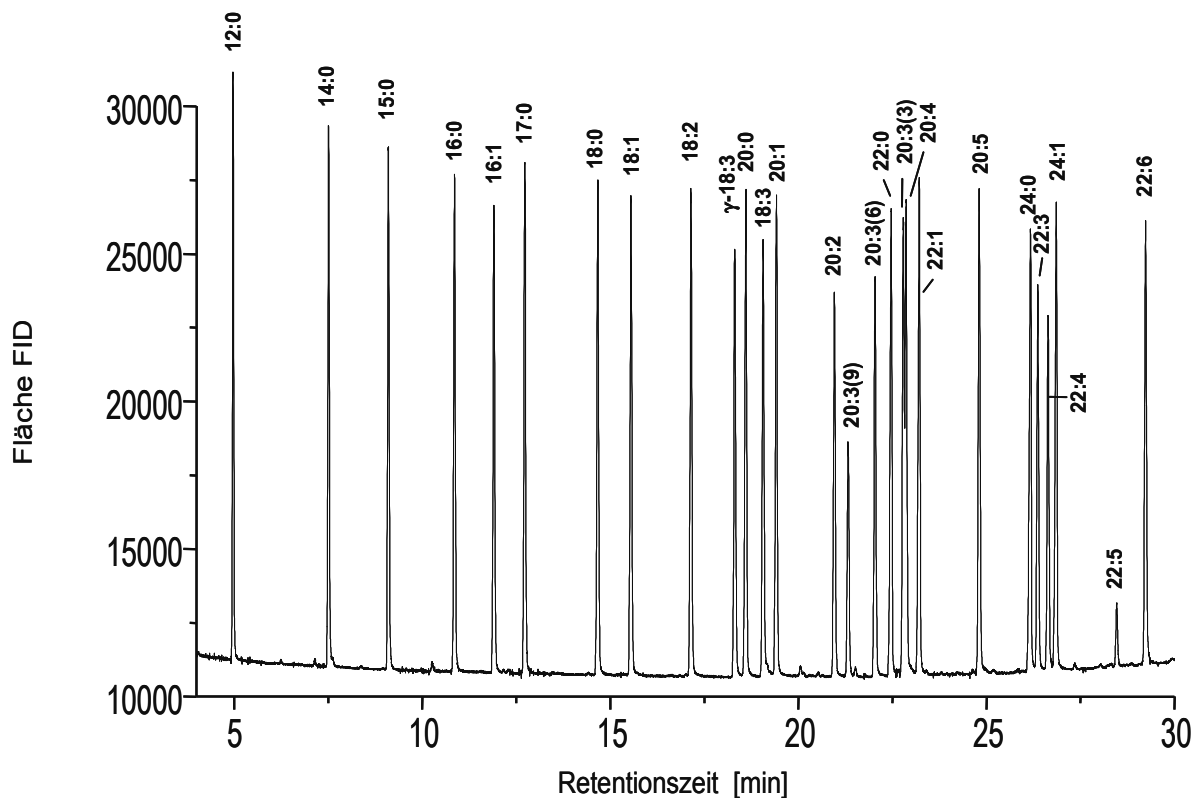


Abbildung 10: Fettsäure-Standard-Mix (mit freundlicher Genehmigung von Reinhold Schmidt)

3.4 Protokoll der Experimente

3.4.1 Gruppeneinteilung

Es wurden Mäuse in einem Alter von 12–16 Wochen bei einem Gewicht von 23–25g für die Eingriffe verwendet.

1. Gruppe: WT Mäuse mit 0 μ g LPS (mit 50 μ l NaCl als Trägerstoff) i.t.
2. Gruppe: WT Mäuse mit 10 μ g LPS (mit 50 μ l NaCl als Trägerstoff) i.t.

3. Gruppe: Fat-1 Mäuse mit 0 μ g LPS (mit 50 μ l NaCl als Trägerstoff) i.t.
4. Gruppe: Fat-1 Mäuse mit 10 μ g LPS (mit 50 μ l NaCl als Trägerstoff) i.t.

3.4.2 Zeitlicher Verlauf

Den Mäusen wurde am Tag 0 entweder NaCl oder LPS intratracheal eingegeben. Nach 4, 24 bzw. 72 Stunden wurden die Mäuse euthanasiert, und es folgten die Blutentnahme, BAL und Organentnahme.

3.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden bei den Tiergruppen die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) berechnet. Eine zwei-faktorielle ANOVA (eine Varianzanalyse) wurde angewendet, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (WT vs. Fat-1 und Zeiten 0h, 4h, 24h, 72h) zu testen. Die RM-ANOVA (*repeat measure two-way analysis of variance*) wurde bei der Temperatur- und Aktivitätsmessung verwendet, um Unterschiede zwischen den Gruppen (WT, WT + LPS, Fat-1, Fat-1 + LPS) und den verschiedenen Zeitpunkten aufzudecken. Die post hoc Analyse wurde mittels der Student–Newman–Keuls Methode durchgeführt. Da die Werte der Leukozyten, MPO, TNF- α , MIP-2 und der Aktivität nicht normalverteilt waren, wurde eine log-Transformation genutzt. Als statistisch signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen. Die Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms SigmaStat Windows 3.5 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Anzahl der Versuchstiere

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf den Versuchsdaten von 314 Mäusen. Davon waren 157 Mäuse Fat-1 Mäuse und 157 C57/Bl6J Mäuse.

Folgende Parameter wurden bestimmt: Histologie des Lungengewebes, Anzahl der Leukozyten in der BAL, Differenzierung der Leukozyten, Bestimmung des leukozytären Enzyms Myeloperoxidase (MPO) im Lungengewebe, Proteinkonzentration in der BAL, Konzentration proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , MIP-2) in der BAL, motorische Aktivität und Körpertemperatur der einzelnen Mäuse und freie Fettsäuren im Plasma.

4.2 Lungenhistologie von WT und Fat-1 Mäusen vor und nach der induzierten Lungenschädigung mit LPS

Die Versuche wurden mit zwei Mauslinien, den WT und den Fat-1 Mäusen, durchgeführt, die in je zwei Gruppen aufgeteilt waren. Eine Gruppe war die Kontrollgruppe, d.h. diesen wurde NaCl intratracheal gegeben, die andere Gruppe wurde mit 10 μ g LPS intratracheal stimuliert. Durch die LPS-Gabe wurde eine akute Lungenschädigung induziert.

LPS wird vom Lungengewebe aufgenommen, und es kommt zu einer Reaktion mit einer Auswanderung von Leukozyten in den Alveolarraum und einem interstitiellen und alveolären Lungenödem, wie in den untenstehenden Abbildungen zu erkennen ist [102]. Eine histologische Untersuchung der Lunge wurde bei WT und Fat-1 Mäusen vor Stimulation mit LPS (0h, Kontrollgruppe), 24h und 72h nach LPS-Gabe durchgeführt. In den Abbildungen 11 a)-f) erkennt man mit Hämatoxylin-Eosin Färbung gefärbte Lungenhistologieschnitte.

In Abbildung 11 a) bei den WT Mäusen und b) bei den Fat-1 Mäusen sieht man die histologischen Lungenschnitte der unstimulierten Gruppe, die keinen relevanten

Unterschied zeigen. Es sind in beiden Gruppen keine pathologischen entzündlichen Infiltrate zu erkennen. Die geringe Anzahl von Leukozyten ist physiologisch.

Abbildung 11 c) zeigt den Lungenhistologieschnitt 24 Stunden nach LPS Instillation bei WT Mäusen. Diese zeigten eine signifikante Invasion von Leukozyten in den Alveolarraum und ins Interstitium sowie die Ausbildung eines interstitiellen Ödems. Auf der Abbildung ist eine massive Zunahme an blau gefärbten Zellkernen zu sehen, die von Leukozyten stammen, und eine Verdickung des Interstitiums. Diese Veränderungen waren auch bei den Lungenhistologieschnitten der Fat-1 Mäuse 24h nach LPS-Gabe in Abbildung 11 d) zu beobachten, jedoch waren sie weniger stark ausgeprägt als bei den WT Mäusen. Das Interstitium ist nicht ganz so stark verbreitert, und man erkennt nicht ganz so viele dunkel gefärbte Zellkerne.

72h nach LPS Gabe waren diese Befunde bei beiden Maustypen noch deutlicher zu sehen. Die Leukozyteninvasion sowie das interstitielle Ödem waren in beiden Gruppen im Vergleich zu 24h verstärkt. Dies sieht man in Abbildung 11 e) bei den WT Mäusen und in f) bei den Fat-1 Mäusen. Es kam wieder zu einem Anstieg der Zellen im Alveolarraum und zu einer verdickten Alveolarwand. Wie schon nach 24h waren die Veränderungen bei den Fat-1 Mäusen nach 72h weniger stark ausgeprägt als bei den WT Mäusen.

Vergleicht man die Veränderungen von den WT und den Fat-1 Mäusen 24h und 72h nach LPS-Gabe, so erkennt man, dass die entzündlichen Veränderungen bei den Fat-1 Mäusen jeweils geringer ausgeprägt waren als bei den WT Mäusen.

Abbildung 11:

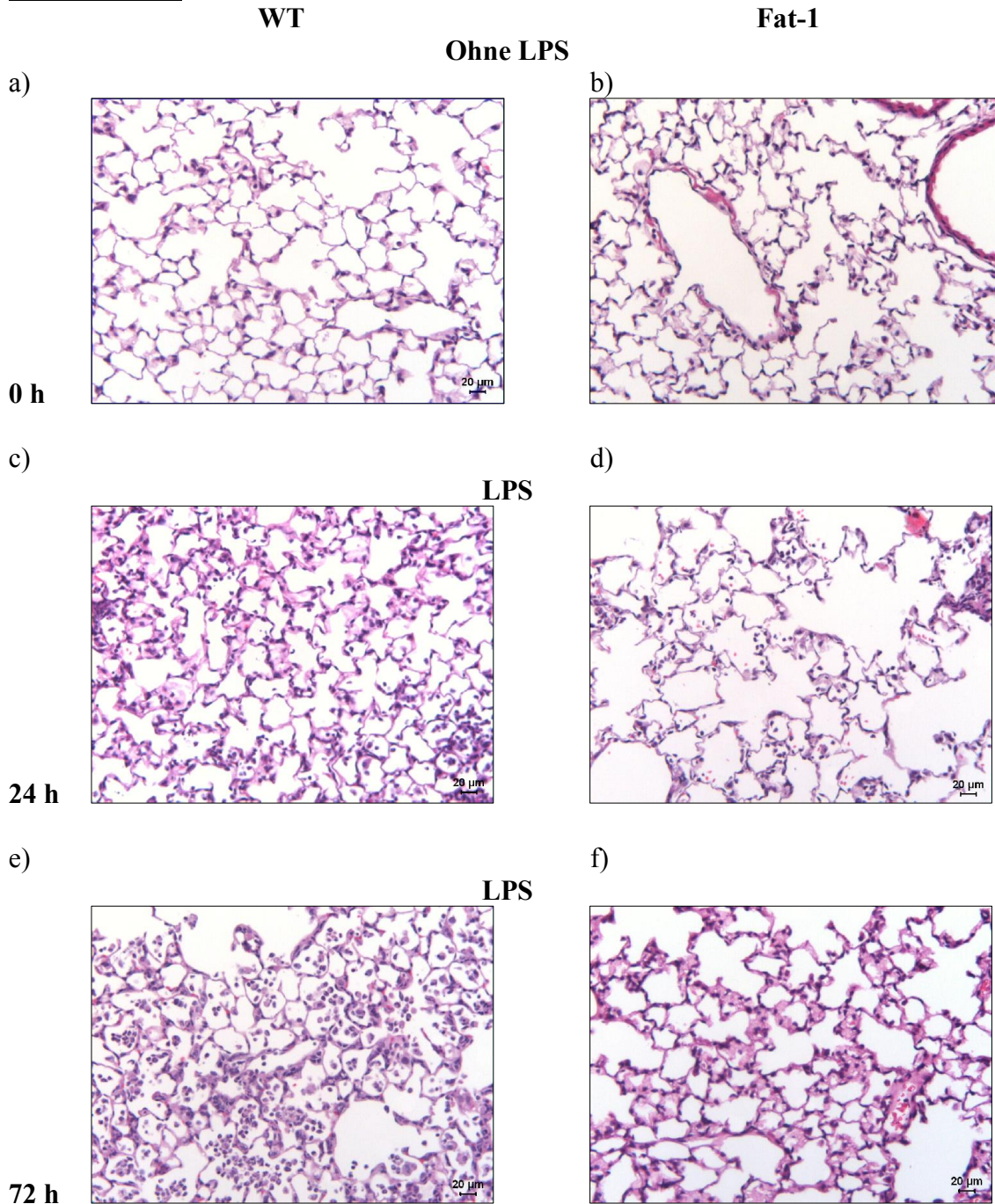


Abbildung 11: Lungenhistologieschnitte von WT und Fat-1 Mäusen vor, 24h und 72h nach der induzierten akuten Lungenschädigung

Bei WT Mäusen (a), c), e)) und bei Fat-1 Mäusen (b), d), f)) wurde eine Lungenhistologie vor (0h; a), b)), 24h (c), d)) und 72h (e), f)) nach intratrachealer Gabe von 10 μ g LPS durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0h, d.h. vor der Lungenschädigung, wurden keine Unterschiede zwischen den WT und Fat-1 Mäusen beobachtet. 24h nach Stimulation mit LPS zeigten die Lungenhistologieschnitte der WT Mäuse, verglichen mit den Lungenhistologieschnitten der Fat-1 Mäuse, eine vermehrte Anzahl an Leukozyten und ein stärkeres interstitielles Ödem. 72h nach LPS-Gabe waren die Veränderungen in beiden Mauslinien verstärkt, wobei in den Lungenhistologieschnitten

der WT Mäuse, verglichen mit den Lungenschnitten der Fat-1 Mäuse, noch deutlich mehr Leukozyten im Alveolarraum zu sehen waren.

4.3 Intraalveoläre Leukozyteninvasion bei WT und Fat-1 Mäusen

Leukozyten gehören zum Immunsystem und erfüllen spezielle Aufgaben in der Abwehr von Krankheitserregern und körperfremden Strukturen. Um den Umfang der Leukozyteninvasion in den Alveolarraum in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf zu messen, wurden Leukozyten in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BAL) bestimmt. Zum Vergleich wurden die Lungen von Tieren beider Gruppen ohne akute Lungenschädigung und 4h, 24h und 72h nach Stimulation mit LPS lavagiert.

4.3.1 Leukozytenzahl in der BAL

In den Kontrollgruppen ohne LPS-Gabe wurden $0,18 \pm 0,01 \times 10^6$ Leukozyten bei den WT Mäusen und $0,08 \pm 0,01 \times 10^6$ Leukozyten bei den Fat-1 Mäusen gezählt. Nach Stimulation mit LPS zeigte sich eine Steigerung der Leukozyteninvasion. 4h nach Stimulation mit LPS wurden bei WT Tieren $0,37 \pm 0,03 \times 10^6$ Leukozyten gezählt, bei Fat-1 Mäusen waren es ähnliche Werte mit $0,33 \pm 0,05 \times 10^6$ Leukozyten. Bei WT Mäusen wurden nach 24h Werte von $2,49 \pm 0,25 \times 10^6$ bestimmt, und bei Fat-1 Mäusen waren es $1,41 \pm 0,18 \times 10^6$ Leukozyten in der BAL. Nach 72h stiegen die Werte der WT Mäuse sogar auf Werte von $3,77 \times 10^6$ und bei Fat-1 Tieren auf $1,70 \times 10^6$ Leukozyten in der BAL. Schon vor der Gabe von LPS war bei den Fat-1 Mäusen, im Vergleich zu den WT Mäusen, eine geringere Zahl an Leukozyten im Alveolarraum vorhanden. In jeder Mausgruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Leukozytenanzahl zwischen den einzelnen Zeitpunkten 0h, 4h, 24h und 72h. Außerdem gab es signifikante Unterschiede zwischen den WT und den Fat-1 Mäusen bei 24h und 72h, die Invasion von Leukozyten bei Fat-1 Mäusen war zu beiden Zeitpunkten deutlich geringer.

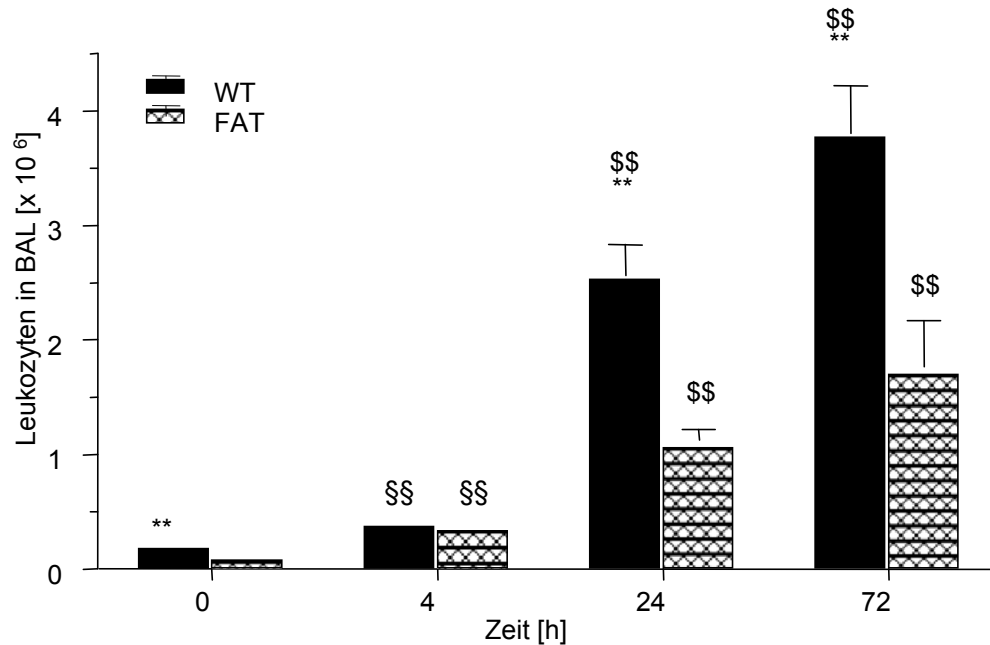


Abbildung 12: Leukozyten in der BAL bei WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Gabe und 4h, 24h und 72h nach LPS-Gabe

Nach Stimulation mit LPS stiegen die Leukozytenzahlen deutlich an. Die 0h Werte unterschieden sich signifikant von den 4h Werten (§§, $p < 0,01$) in der WT-Gruppe. Die 0h und 4h Werte unterschieden sich signifikant von den 24 und 72h Werten (§§, $p < 0,01$) in beiden Mausgruppen. Nach der LPS-Gabe war die Invasion von Leukozyten bei Fat-1 Mäusen nach 24h und 72h deutlich geringer als bei den WT Mäusen (**, $p < 0,01$).

Dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 6-8$ für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt.

4.3.2 Differenzierung der Leukozyten aus der BAL

Die quantitative Zusammensetzung der Leukozyten wurde mittels einer Differenzierung erfasst. Aufgrund ihrer Färbeeigenschaften in der Pappenheim-Färbung können Leukozyten in Untergruppen unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Leukozyten in neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen unterteilt.

Der prozentuale Anteil von neutrophilen Granulozyten an den Zellen in der BAL betrug ohne Stimulation mit LPS in beiden Mausstämmen unter 2%. Nach 24h war die Fraktion der neutrophilen Granulozyten an Zellen in der BAL bei WT Mäusen $89 \pm 2\%$ und bei Fat-1 Mäusen $87 \pm 2\%$. 72h nach Gabe von LPS betrug die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL der WT Mäuse $77 \pm 9\%$ und die der Fat-1 Mäuse $84 \pm 2\%$.

Vor der Lungenschädigung waren in WT Mäusen $5 \pm 1\%$ der Zellen in der BAL Lymphozyten. Im Vergleich dazu war der prozentuale Anteil an Lymphozyten bei Fat-1 Mäusen mit $10 \pm 2\%$ doppelt so hoch. Die WT Mäuse hatten einen Anteil von $3 \pm 1\%$ an Lymphozyten 24h nach LPS-Gabe, ohne signifikanten Unterschied, verglichen mit den Fat-1 Mäusen mit einem Anteil von $2 \pm 1\%$ an den Gesamtzellen. 72h nach Stimulation mit LPS betrug der prozentuale Anteil der Lymphozyten in der BAL in den WT Mäusen $10 \pm 5\%$ und in den Fat-1 Mäusen $4 \pm 1\%$.

Vor der Stimulation mit LPS waren mehr als $94 \pm 3\%$ Monozyten/Makrophagen in den Zellen der BAL der WT Mäuse vorhanden. Im Vergleich dazu zeigten Fat-1 Mäuse nur einen Anteil von $86 \pm 3\%$ Monozyten/Makrophagen. Die prozentualen Anteile von Monozyten/Makrophagen glichen sich 24h nach der Stimulation mit LPS aneinander an und waren in beiden Gruppen kleiner $11 \pm 2\%$, das bedeutet eine deutliche Verminderung der Monozyten/Makrophagen Konzentration. Nach 72h lag bei den WT Mäusen eine Konzentration an Monozyten/Makrophagen von $13 \pm 5\%$ vor, bei den Fat-1 Mäusen $12 \pm 1\%$.

Der Unterschied von Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen zum Zeitpunkt 0h war zwischen WT Mäusen und Fat-1 Mäusen signifikant ($p < 0,05$, $n = 6-8$).

4.4 Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge bei akuter Lungenschädigung

Myeloperoxidase ist ein Enzym, das sich in den Granula der Leukozyten befindet und bei der Regulation von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle spielt. Die Freigabe aus den aktivierten Leukozyten in Phagolysosomen oder in den Extrazellulärraum ist eine Antwort auf unterschiedliche Agonisten [103].

Bei den entsprechenden Versuchen wurde das Gewebe einer vollständigen, lavagierten Lunge verwendet, um eine kinetische Aktivitätsmessung der leukozytären Myeloperoxidase (MPO) vorzunehmen.

Die interstitiellen und intravaskulären Leukozyten in der Lunge der Kontrollgruppen ohne (0h), 4h, 24h und 72h nach LPS-Gabe wurden mit Hilfe des Myeloperoxidase Tests gemessen. Vor Stimulation zeigten die WT Mäuse Werte von $1,9 \pm 0,3$ U/g Gewebe, die Fat-1 Tiere $2,8 \pm 0,9$ U/g Gewebe. Bei beiden Mausgruppen stiegen die MPO Werte nach Gabe von LPS an, jedoch zeigten die Fat-1 Mäuse einen wesentlich schwächeren Anstieg, verglichen mit den WT Tieren.

4h nach Stimulation mit LPS erreichten die WT Mäuse MPO-Werte von $17,5 \pm 0,7$ U/g Gewebe, die Fat-1 Mäuse hatten Werte von $16,2 \pm 0,8$ U/g Gewebe.

Die MPO-Werte der WT Tiere erreichten bei 24h Höchstwerte mit $22,4 \pm 2,8$ U/g Gewebe. Dieser Anstieg der MPO-Werte war bei Fat-1 Mäusen deutlich abgeschwächt und wich mit Werten von $15,1 \pm 1,9$ U/g Gewebe signifikant von den 24h Werten der WT Mäuse ab.

72h nach LPS-Gabe waren die MPO-Werte wieder deutlich abgesunken. Die WT Mäuse hatten Werte von $7,1 \pm 1,5$ U/g Gewebe, die Fat-1 Mäuse $8,2 \pm 2,0$ U/g Gewebe.

Die 0h und die 72h MPO-Werte waren signifikant geringer im Vergleich zu den 4h und 24h Werten in beiden Gruppen.

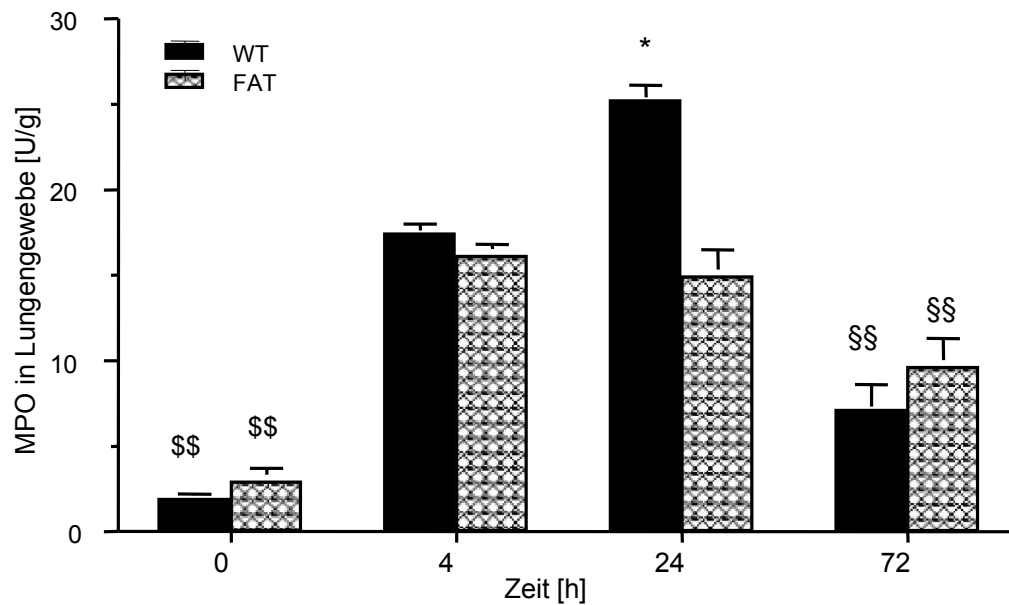


Abbildung 13: MPO-Aktivität bei WT und Fat-1 Mäusen vor Stimulation mit LPS und 4h, 24h und 72h nach 10µg intratrachealer LPS-Gabe

Nach der LPS Stimulation stieg die MPO-Aktivität in der Lunge signifikant an, mit einem Peak bei 24h. Der Anstieg der WT Mäuse war im Vergleich zu den Fat-1 Mäusen nach 24h signifikant höher (*, $p < 0,05$). Die MPO-Werte ohne Stimulation (\$\$) mit LPS und 72h (§§) nach LPS-Gabe unterschieden sich signifikant von den 4h und 24h Werten in beiden Gruppen ($p < 0,01$).

Dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 6-8$ für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt.

4.5 Proteingehalt der BAL

Durch die Lungenentzündung kam es zu einer Schädigung der endothelialen und epithelialen Barriere und damit zu einer erhöhten Permeabilität für Proteine. Aufgrund der vermehrten Durchlässigkeit konnte das Protein aus dem Gefäßbett austreten und in die Alveolen einwandern. Dadurch kam es zu einem erhöhten Proteingehalt in den Alveolen. Dieser wurde in der Lavageflüssigkeit bestimmt.

Die Proteinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit bei den WT Mäusen vor LPS-Instillation der Lunge betrug $136 \pm 36 \mu\text{g/ml}$, die der Fat-1 Mäuse $103 \pm 26 \mu\text{g/ml}$. Bis 72h nach Stimulation mit LPS konnte ein stetiger Anstieg des Proteingehalts in der Lavageflüssigkeit beobachtet werden. Nach 4h wurden bei WT Mäusen Werte um die $400 \pm 50 \mu\text{g/ml}$ gemessen, bei den Fat-1 Mäusen um die $160 \pm 30 \mu\text{g/ml}$. Nach 24h war der Gehalt bei WT Tieren auf ca. $700 \pm 110 \mu\text{g/ml}$ angestiegen, bei den Fat-1 Mäusen auf ca. $300 \pm 50 \mu\text{g/ml}$. Die 72h Werte der WT Tiere waren mit $1230 \pm 190 \mu\text{g/ml}$ fast 10mal höher als die Ausgangswerte. Auch der Proteingehalt der Fat-1 Mäuse stieg weiter an, auf $770 \pm 110 \mu\text{g/ml}$.

Bei den WT Mäusen unterschied sich die Proteinkonzentration zu allen Zeitpunkten untereinander signifikant. Bei den Fat-1 Mäusen war die Proteinkonzentration zwischen den Mäusen ohne LPS-Stimulation und 24h und 72h signifikant. Außerdem zeigten die Fat-1 Mäuse 24h und 72h nach Stimulation signifikante Unterschiede untereinander.

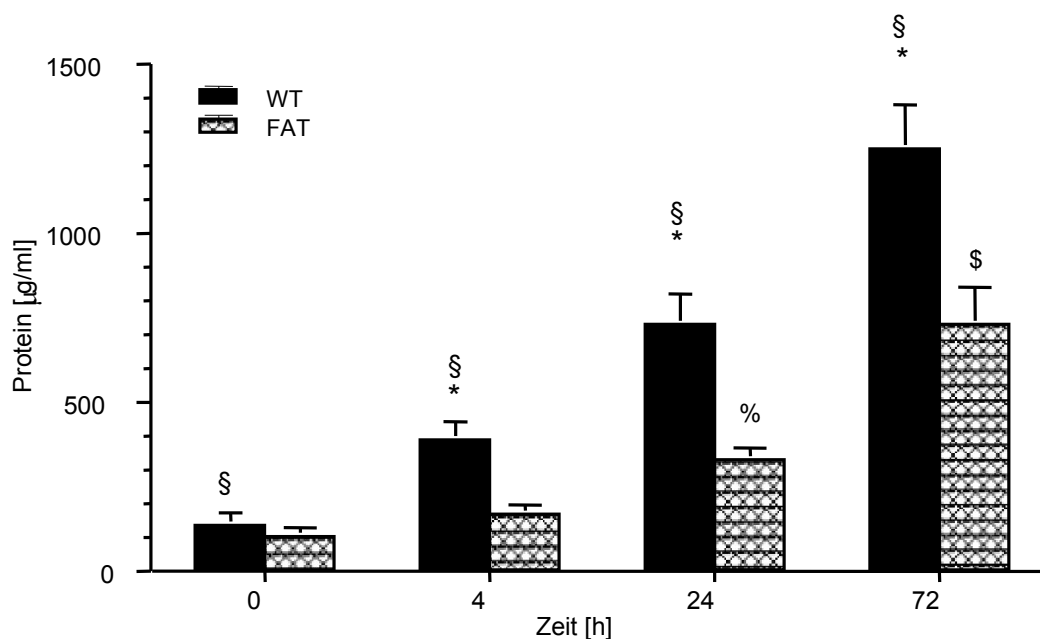


Abbildung 14: Proteinaustritt bei akuter Lungenschädigung bei WT und Fat-1 Mäusen vor Stimulation mit LPS und 4h, 24h und 72h nach 10µg intratrachealer LPS-Gabe

Die Proteinkonzentration stieg nach der LPS-Gabe stetig an. Der Unterschied der Werte der WT Mäuse untereinander war zu allen Zeitpunkten signifikant (§, $p < 0,05$). Bei Fat-1 Mäusen unterschied sich die Proteinkonzentration nach 24h und 72h signifikant von der Proteinkonzentration ohne Stimulation mit LPS zu allen Zeitpunkten (% und §, $p < 0,05$, beziehungsweise für die Vergleiche). Fat-1 Mäuse zeigten zu allen Zeitpunkten niedrigere Proteinkonzentrationen in der BAL bei akuter Lungenschädigung, verglichen zu WT Tieren (*, $p < 0,05$).

Dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 6-8$ für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt.

4.6 Bildung proinflammatorischer Zytokine bei akuter Lungenschädigung

Als Parameter für proinflammatorische Zytokine wurden der Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) und das Makrophagen-inflammatorische Protein-2 (MIP-2) in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit mit Hilfe von ELISA bestimmt.

4.6.1 Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α)

Nach Stimulation mit LPS wird TNF- α von unterschiedlichen Entzündungszellen, hauptsächlich aber von Makrophagen, gebildet und freigesetzt. Die Freisetzung und Bildung dieses Zytokins kann den Zelltod, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung anregen [104]. Die Ausgangswerte für TNF- α der beiden Gruppen waren ähnlich. WT Mäuse hatten vor der LPS-Gabe TNF- α Werte von 254 ± 23 pg/ml, die Werte der Fat-1 Mäuse betrugen 291 ± 34 pg/ml. 4h nach Stimulation mit LPS erreichte TNF- α in beiden Gruppen seine höchsten Werte. Die 4h Werte betrugen bei den WT Mäusen 2066 ± 234 pg/ml, bei den Fat-1 Tieren 2303 ± 212 pg/ml. Die 24h und 72h Werte waren ähnlich wie die Ausgangswerte. Die 24h Werte betrugen bei den WT Mäusen 219 ± 22 pg/ml und bei den Fat-1 Mäusen 313 ± 31 pg/ml. Die 72h Werte waren 176 ± 14 pg/ml bei den WT Mäusen und bei den Fat-1 Mäusen 148 ± 27 pg/ml. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei 0h, 24h und 72h deutlich. Die 4h Werte beider Mausgruppen unterschieden sich signifikant zu den anderen Zeitpunkten.

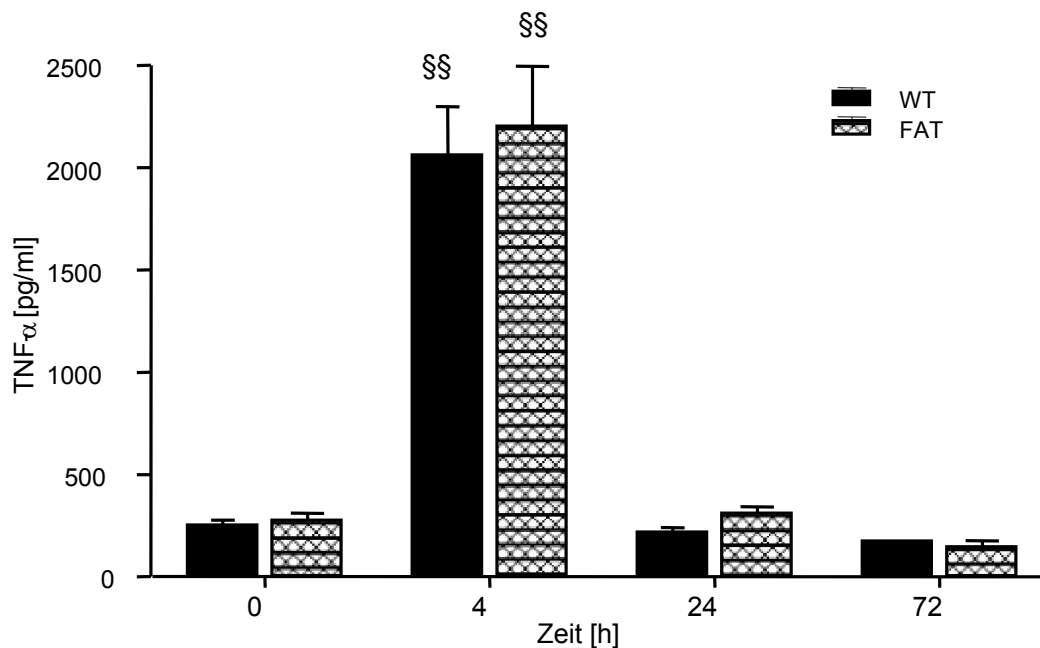


Abbildung 15: TNF- α Konzentration bei WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Gabe und 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10 μ g LPS

Nach der LPS-Stimulation stieg die TNF- α Konzentration in der Lunge in den ersten 4h signifikant an. Es gab einen signifikanten Unterschied von den 4h Werten zu den 0h, 24h und 72h Werten (§§, $p < 0,01$ 4h vs. 0, 24, 72h). Die TNF- α Konzentrationen waren nach 24h wieder auf die Ausgangswerte zurück gefallen. Auch nach 72h wurden bei beiden Mauslinien Werte ähnlich der Anfangswerte gemessen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den 0h, 24h und 72h Werten. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Fat-1 Mäusen zu allen Zeitpunkten festgestellt.

Dargestellt sind MW \pm SEM, $n = 6-8$ für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt.

4.6.2 Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)

MIP-2 gehört zu der Gruppe der Zytokine, ist ein Chemokin und ähnelt in seiner Wirkungen dem humanen Interleukin-8. Es wird, wie TNF- α , von unterschiedlichen Zelltypen gebildet und besitzt chemotaktische Aktivität [105].

Der Ausgangswert für MIP-2 in WT Mäusen ohne LPS-Gabe betrug 83 ± 10 pg/ml. Der 0h Wert der Fat-1 Mäuse war mit 209 ± 49 pg/ml schon vor Stimulation mit LPS signifikant höher als der Wert der WT Mäuse. Bei den WT Tieren lag der Höchstwert der MIP-2 Konzentration nach 4h bei 2155 ± 132 pg/ml, die Konzentration der Fat-1 Mäuse unterschied sich signifikant mit 1168 ± 237 pg/ml. 24h nach Stimulation mit LPS

sank die Konzentration in beiden Mausgruppen wieder ab. Die WT Mäuse erreichten Werte von $185 \pm 21\text{pg/ml}$, die Fat-1 Mäuse $259 \pm 26\text{pg/ml}$. Nach 72h wurden sogar niedrigere Werte als die Ausgangswerte gemessen. Die WT Mäuse hatten eine Konzentration von $36 \pm 5\text{pg/ml}$, die Fat-1 Mäuse $31 \pm 7\text{pg/ml}$.

Die Ausgangswerte unterschieden sich zu den 4h und 72h Werten signifikant bei den WT und Fat-1 Mäusen. Ebenfalls unterschieden sich die 24h Werte signifikant zu den 4h und 72h Werten in beiden Mauslinien. Die Unterschiede bei den WT Mäusen waren zu allen Zeitpunkten, d.h. 0h, 4h, 24h und 72h signifikant untereinander. Bei den Fat-1 Mäusen waren die 0h und 24h Werte vergleichbar.

Die Zytokinkonzentration in der BAL an den verschiedenen Zeitpunkten war bei Fat-1 Mäusen vergleichbar wie bei WT Mäusen, jedoch waren die Konzentrationen bei den 4h Werten der Fat-1 Tiere nur halb so hoch wie die der WT Mäuse.

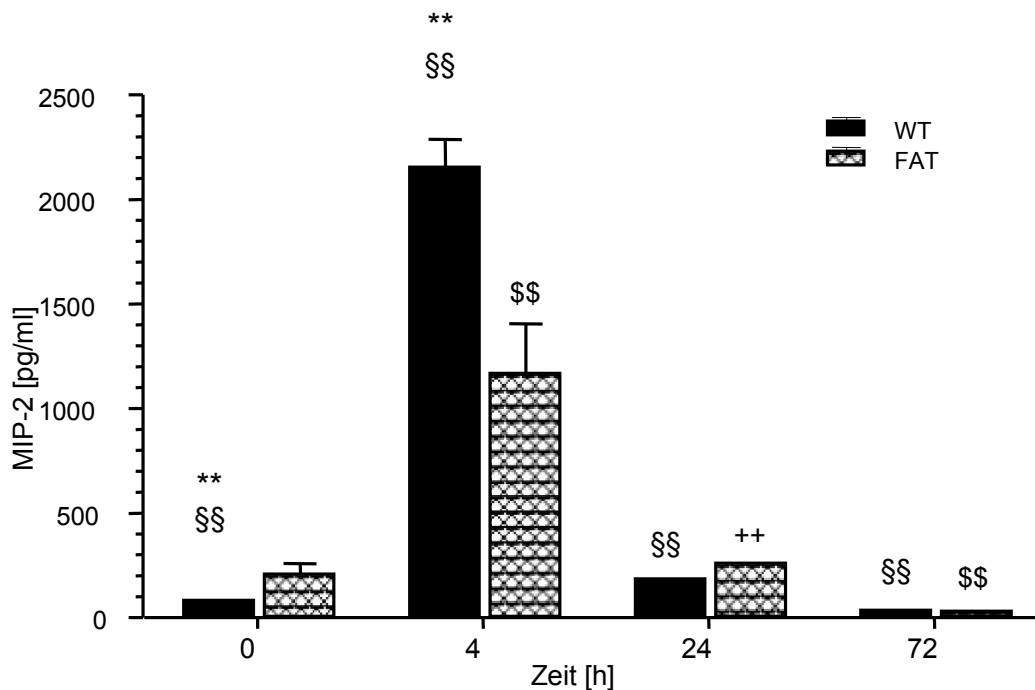


Abbildung 16: MIP-2 Konzentrationen bei WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Gabe und 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit $10\mu\text{g}$ LPS

Nach der LPS-Stimulation stieg die MIP-2 Konzentration in der Lunge beider Gruppen in den ersten 4h signifikant an und war nach 72h unter die Ausgangswerte abgesunken. Die Unterschiede zwischen allen Zeitpunkten waren bei den WT Mäusen signifikant (§§, $p < 0,01$ für jeden Vergleich). In der Fat-1 Gruppe unterschieden sich die Werte von MIP-2 bei 4h und 72h von den 0h und 24h Werten (§§, $p < 0,01$). Die Konzentration von MIP-2 nach 24h unterschied sich von Werten bei 4h und 72h, nicht aber von den Ausgangswerten (++, $p < 0,01$). Der Anstieg der MIP-2 Konzentration

nach LPS-Gabe war in Fat-1 Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen bei 4h abgeschwächt (**, $p < 0,01$ vs. WT). Dargestellt sind $MW \pm SEM$, $n = 6-8$ für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt.

4.7 Motorische Aktivität und Körpertemperatur bei Mäusen mit akuter Lungenschädigung

Dem Augenschein nach ging es den Fat-1 Mäusen mit akuter Lungenschädigung besser als den WT Mäusen. Die WT Mäuse saßen zusammengekauert mit gesträubtem Fell in einer Ecke des Käfigs, während die Fat-1 Mäuse mit glattem Fell im Käfig umher liefen. Zur Quantifizierung der beobachteten Unterschiede wurden die Körpertemperatur und die Aktivität bei den unterschiedlichen Mausgruppen bestimmt. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich mit Hilfe eines Transmitters alle fünf Minuten aufgezeichnet [106]. Eine Durchschnittstemperatur wurde für jedes Tier alle 12h berechnet. Aktivitätsimpulse wurden alle fünf Minuten gezählt und für 12h zusammengefasst, um eine Gesamtmessung für die Tag- und Nachtaktivität zu bekommen. Sie wurden als Aktivitätszählung in 12h angegeben.

4.7.1 Motorische Aktivität

Die WT und die Fat-1 Mäuse wiesen in der Gruppe mit NaCl-Installation eine vermehrte Nachtaktivität (N0) im Vergleich zur Tagaktivität (T0) auf. Die Frequenz und das Bewegungsmuster waren in der Kontrollgruppe auch nach intratrachealer Gabe von Kochsalzlösung ungestört. Nach Stimulation mit LPS fand eine Angleichung des Tag (T1-T3) und Nacht (N1-N3) Musters durch eine drastische Reduktion der Bewegungen statt.

Insgesamt kam es bei den WT Mäusen nach Stimulation mit LPS zu einer Aktivitätsminderung mit einem signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Tagen. Einen besonderen Unterschied gab es am zweiten Tag.

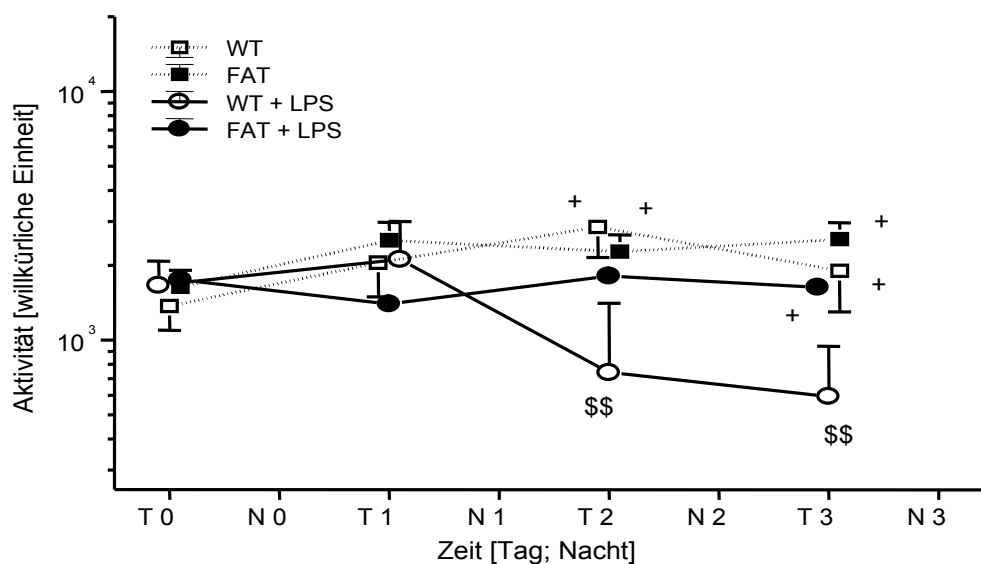
Bei Fat-1 Mäusen war der Rückgang der Bewegung deutlich geringer ausgeprägt als bei den WT Mäusen. Die Fat-1 Mäuse zeigten keinen nachweisbaren Unterschied in der

Tagesaktivität vor und nach akuter Lungenschädigung (T0 vs. T1-T3). Die Nachtaktivität zeigte Unterschiede auf.

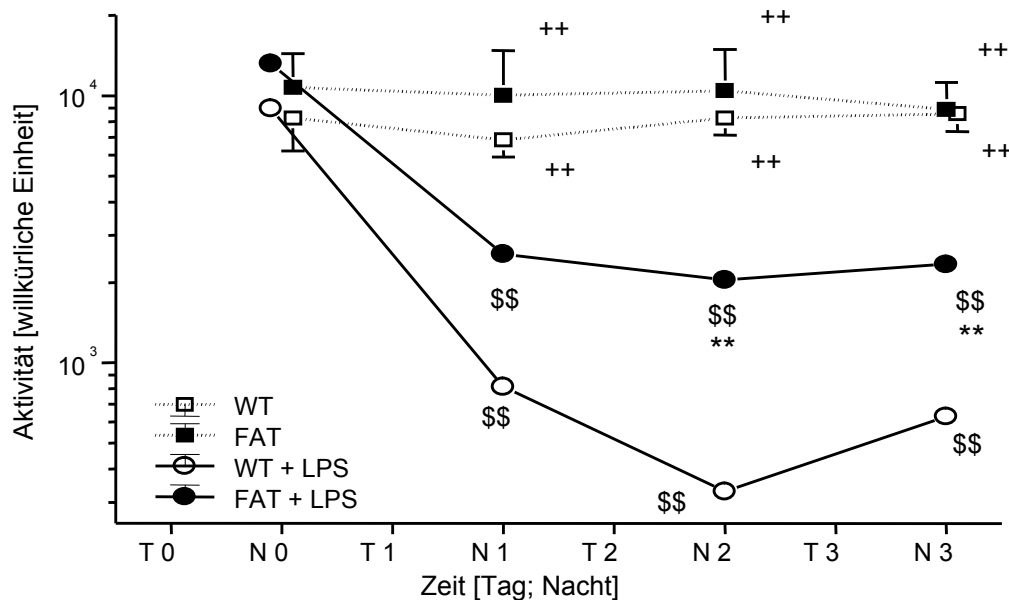
Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien an den Tagen und Nächten nach Stimulation. Am dritten Tag zeigten die Fat-1 Mäuse mehr motorische Aktivität als die WT Mäuse.

Das Bewegungsmuster und die Frequenz der WT und Fat-1 Mäuse ohne LPS unterschied sich signifikant von dem der Mäuse mit LPS.

Abbildung 17:



a) Motorische Tagaktivität von WT und Fat-1 Mäusen



b) Motorische Nachtaktivität von WT und Fat-1 Mäusen

Abbildung 17 a) und b): Motorische Tag- und Nachtaktivität von WT und Fat-1 Mäusen

WT und Fat-1 Mäuse wurden in Einzelkäfigen in einer Klimakammer mit einer Temperatur von 30°C, 50% Luftfeuchtigkeit und einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die motorische Aktivität am Tag (a) und in der Nacht (b) wurde unter Basisbedingungen (Tag 0, T0; Nacht 0, N0) und nach intratrachealer LPS- oder 0,9% NaCl-Gabe (Tag 1–Tag 3, T1–T3; Nacht 1–Nacht 3, N1–N3) aufgezeichnet.

Die Tagaktivität (T) war bei WT Mäusen mit LPS-Gabe ab dem zweiten Tag erniedrigt (\$\$, $p < 0,01$ vs. T0; +, $p < 0,05$ WT mit LPS vs. WT und Fat-1 ohne LPS und Fat-1 mit LPS an T3). Die Nachtaktivität war in beiden Gruppen mit akuter Lungenschädigung reduziert (\$\$, $p < 0,01$ vs. N0; ++ $p < 0,01$ WT und Fat-1 mit LPS vs. Gruppen ohne LPS-Gabe), jedoch zeigten die mit LPS stimulierten Fat-1 Mäuse eine höhere motorische Aktivität verglichen mit den WT Mäusen mit LPS (**, $p < 0,01$).

4.7.2 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur war während der Nacht verglichen mit der des Tages in allen Gruppen mit NaCl-Instillation höher. Die durchschnittliche Temperatur der WT Mäuse mit NaCl-Instillation am Tag betrug 36,7°C, in der Nacht 37,4°C. Die durchschnittliche

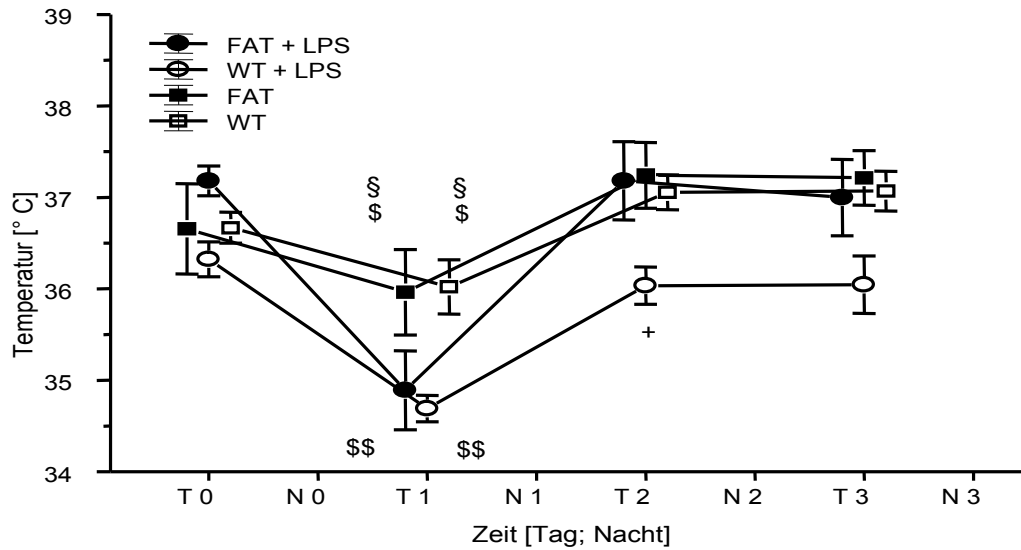
Temperatur der Fat-1 Mäuse betrug am Tag 36,8°C und in der Nacht 37,2°C. Das Ergebnis - eine höhere Körpertemperatur während der Nacht - ist vereinbar mit der erhöhten Nachtaktivität der Mäuse. Nach der Gabe von Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe fiel die Temperatur in beiden Gruppen um 0,5°C. Die Gruppen mit normaler Kochsalzlösung unterschieden sich signifikant von denen mit LPS-Instillation schon am ersten Tag.

Die durchschnittliche Temperatur der WT Mäuse nach Stimulation mit LPS betrug am Tag 35,8°C und in der Nacht 35,9°C. Bei den WT Mäusen fiel die Temperatur in der ersten Nacht nach LPS Stimulation von 37,3°C auf 35,5°C. Die WT Mäuse mit akuter Lungenschädigung wiesen eine reduzierte Körpertemperatur bis zur dritten Nacht nach der Stimulation (N3) auf und erholten sich bis zum Versuchsende nicht. Die Temperatur der WT Mäuse unterschied sich nach Stimulation mit LPS signifikant zu allen anderen Gruppen zu allen Zeitpunkten.

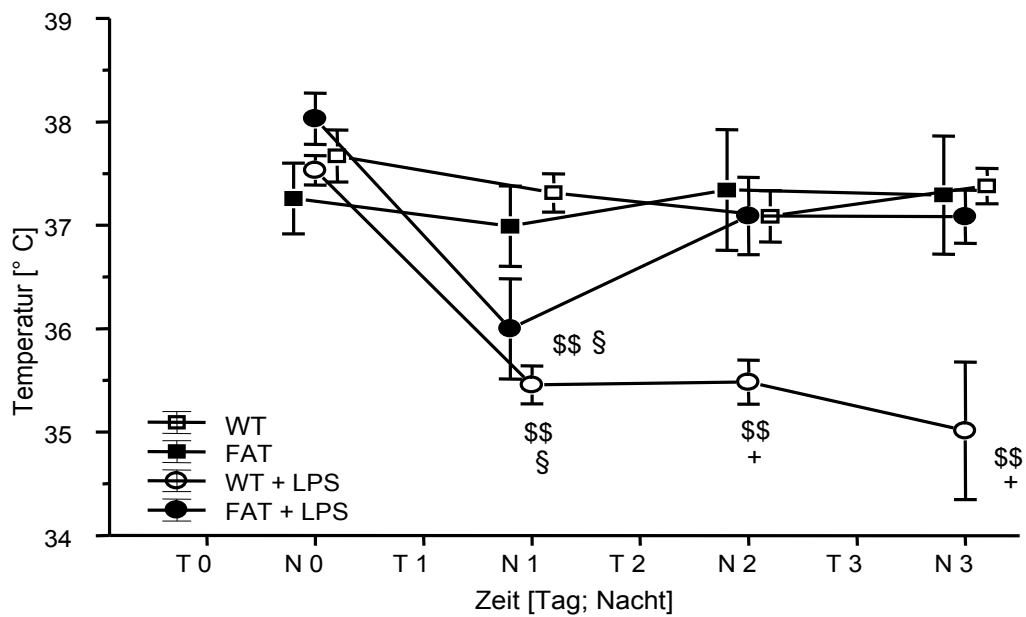
Die durchschnittliche Temperatur der Fat-1 Mäuse nach LPS Gabe betrug am Tag 36,6°C und in der Nacht 37,1°C. Beide Gruppen mit intratrachealer NaCl-Gabe und die Fat-1 Gruppe mit LPS-Gabe hatten schon zu Beginn des zweiten Tages (T2) die ursprüngliche Temperatur wieder erreicht. Der Unterschied zwischen dem ersten und zweiten Tag war jedoch signifikant.

Der Temperaturabfall war auch schon in der ersten Nacht nach Stimulation mit LPS in beiden Gruppen signifikant. Die Fat-1 Mäuse erholten sich am zweiten Tag und zeigten einen signifikanten Unterschied zu den WT Mäusen.

Abbildung 18:



a) Körpertemperatur über Tag bei WT und Fat-1 Mäusen



b) Körpertemperatur über Nacht bei WT und Fat-1 Mäusen

Abbildung 18 a) und b): Körpertemperatur über Tag und Nacht bei WT und Fat-1 Mäusen

WT und Fat-1 Mäuse wurden in Einzelkäfigen in einer Klimakammer mit einer Temperatur von 30°C, 50% Luftfeuchtigkeit und einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Temperatur wurde am Tag (a) und in der Nacht (b) unter Basisbedingungen (Tag 0, T0; Nacht 0, N0) und nach intratrachealer LPS- oder 0,9% NaCl-Gabe (Tag 1–Tag 3, T1–T3; Nacht 1–Nacht 3, N1–N3) aufgezeichnet.

Die Körpertemperatur sank in allen Gruppen am ersten Tag (§ und \$\$, $p < 0,05$ und $p < 0,01$ vs. Ausgangswerte). Beide Kontrollgruppen hatten, verglichen mit den LPS-Gruppen, eine höhere Temperatur (§, $p < 0,05$). Während die Fat-1 Mäuse ihre normale Tagestemperatur schon am zweiten Tag wieder erreicht hatten, unterschieden sich die WT Mäuse von allen anderen Gruppen an Tag 2 und Tag 3 in ihrer Körpertemperatur (+, $p < 0,05$). Die durchschnittliche Nachttemperatur war in beiden Gruppen mit akuter Lungenschädigung in der ersten Nacht erniedrigt, die Fat-1 Mäuse erreichten jedoch die Ausgangswerte wieder, die WT Mäuse hatten bis zum Versuchsende eine erniedrigte Körpertemperatur (\$\$, $p < 0,01$ vs. Basiswerte). Der Unterschied der Körpertemperatur der WT und Fat-1 Mäuse mit LPS war verglichen mit den Kontrollgruppen in N1 signifikant (§, $p < 0,05$). Die Temperatur blieb bei den mit LPS stimulierten WT Mäusen vermindert, jedoch nicht in den Fat-1 Mäusen mit akuter Lungenschädigung (+, $p < 0,05$ vs. alle anderen Gruppen).

4.8 Freie Fettsäuren im Plasma

Fat-1 Mäuse können ω -6 Fettsäuren in mehrfach ungesättigte ω -3 Fettsäuren (PUFA) konvertieren, da sie das *Caenorhabditis elegans* Fat-1 Gen besitzen, das eine ω -3 Fettsäuredesaturase kodiert [98, 99]. Es wurden freie Fettsäuren im Plasma von Mäusen ohne Stimulation mit LPS (0h) und 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Gabe von 10 μ g LPS bestimmt, wobei die Arachidonsäure (AA), die Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA) näher betrachtet wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse als Konzentration der AA, EPA, DHA, das Verhältnis zwischen AA/(EPA+DHA) und die Summe aller freien Fettsäuren.

4.8.1 Arachidonsäure (AA)

Die Konzentration von AA in WT Mäusen ohne LPS Gabe betrug $5,5 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$. In Fat-1 Mäusen war die Konzentration zu dem Zeitpunkt mit Werten von $6,0 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$ ähnlich. Vier Stunden nach Stimulation mit LPS verdreifachten sich die Werte der AA in WT Mäusen auf $18,0 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$. Die Konzentration stieg bei Fat-1 Mäusen nur halb so hoch auf $9,0 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$, d.h. es lag bei WT und Fat-1 Mäusen ein signifikanter Unterschied nach 4h vor. Die Konzentration der AA war bei den WT Tieren nach 24h wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt und betrug $6,1 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$. Die Konzentration der AA war bei Fat-1 Mäusen nach 24h mit $2,3 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ signifikant unter den Ausgangswert gesunken. Nach 24h bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den WT und den Fat-1 Mäusen. Die Fat-1 Mäuse erreichten die Anfangskonzentration nach 72h. Bei den WT Tieren lagen die Werte für AA 72h nach Gabe von LPS im Durchschnitt bei $6,6 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$ und bei den Fat-1 Mäusen bei $4,3 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$.

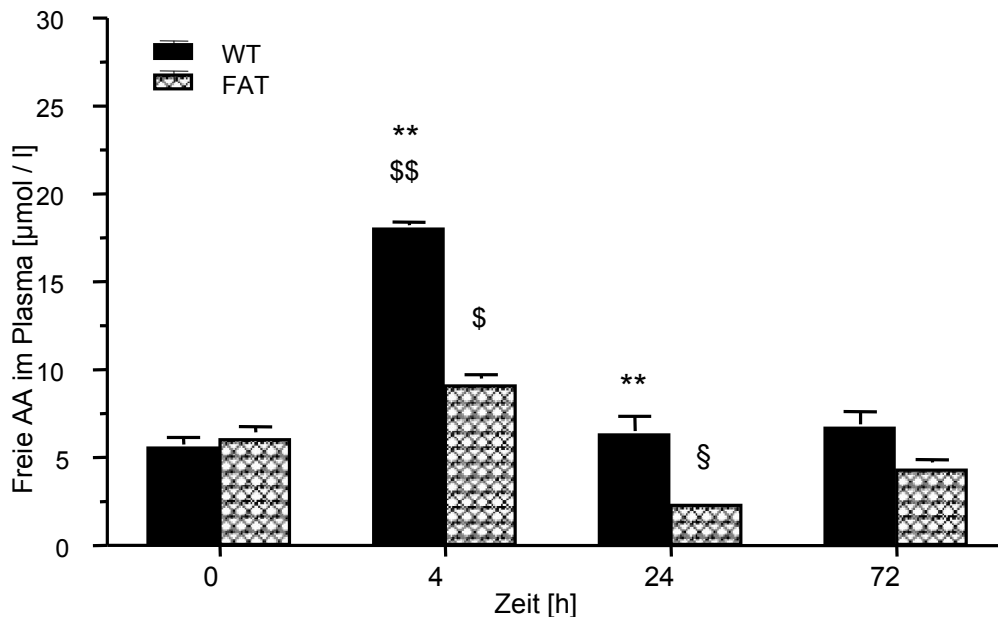


Abbildung 19: Konzentration von Arachidonsäure in WT und Fat-1 Mäusen bei 0h, 4h, 24h und 72h

0h, 4h, 24h und 72h nach Stimulation mit 10μg LPS wurde Blut von WT und Fat-1 Mäusen entnommen und die Arachidonsäure (AA) bestimmt. Die Konzentration von AA stieg nach 4h im Vergleich zu den 0h, 24h und 72h Werten signifikant an. Bei den Fat-1 Mäusen mit einer Signifikanz von $p < 0,05$, bei den WT Mäusen mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ (§ und \$\$, $p < 0,05$ und $0,01$ vs. alle anderen Zeitpunkte). Nach 24h fiel die Konzentration der AA bei Fat-1 Mäusen unter die Ausgangswerte mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Ausgangswerten und den 24h Werten der Fat-1 Mäuse von $p < 0,05$ (§, $p < 0,05$). Die Konzentration der AA bei WT und Fat-1 Mäusen unterschied sich bei 4h und 24h signifikant voneinander (**, $p < 0,01$). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM mit $n = 6-8$ dargestellt.

4.8.2 Eicosapentaensäure (EPA) und Docosapentaensäure (DHA)

Fat-1 Mäuse zeigten höhere Konzentrationen der ω -3 Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) bei den 0h Werten. Die Konzentration bei den WT Mäusen der EPA betrug $0,5 \pm 0,1 \mu\text{mol/ml}$ und der DHA $1,8 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$. Im Vergleich dazu betrug die Konzentration von EPA bei Fat-1 Mäusen ohne Stimulation mit LPS $1,5 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$, von DHA $6,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$. Dies ist ein signifikanter Unterschied der EPA und DHA Konzentrationen zwischen den WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Instillation. 4h nach Stimulation mit LPS konnte bei den WT Mäusen ein

Anstieg der ω -3 Fettsäuren gemessen werden. Die 4h Werte von EPA betrugen $1,3 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$ und von DHA $13,9 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$. Bei den Fat-1 Mäusen konnte nach 4h ein massiver Anstieg der ω -3 Fettsäurekonzentrationen gemessen werden. Die Werte für EPA lagen bei $6,0 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$ und für DHA bei $24,2 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$. Die Summe der ω -3 Fettsäuren, d.h. EPA und DHA, war mit $30,0 \mu\text{mol/l}$ bei Fat-1 Mäusen fast doppelt so hoch wie die der WT Mäuse mit $15,2 \mu\text{mol/l}$. Auch die 24h und 72h Werte unterschieden sich bei den WT und Fat-1 Mäusen signifikant. Die WT Mäuse zeigten 24h nach Gabe von LPS EPA-Konzentrationen von $0,9 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ und DHA-Werte von $2,3 \pm 1,4 \mu\text{mol/l}$. Bei den Fat-1 Mäusen waren die Ergebnisse jeweils höher. EPA betrug $1,8 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$, DHA $6,3 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$. 72h nach der Stimulation mit LPS waren die Konzentrationen der ω -3 Fettsäuren wieder auf die Ausgangswerte abgesunken, bei den WT Tieren sogar unter die 0h Werte gefallen. EPA betrug nach 72h bei WT Tieren $0,3 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$, DHA $2,7 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$. Bei Fat-1 Mäusen betrugen die Konzentrationen von EPA $1,7 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ und von DHA $6,2 \pm 1,4 \mu\text{mol/l}$.

Die Unterschiede bei WT und Fat-1 Mäusen waren bei EPA und DHA zu allen Zeitpunkten signifikant.

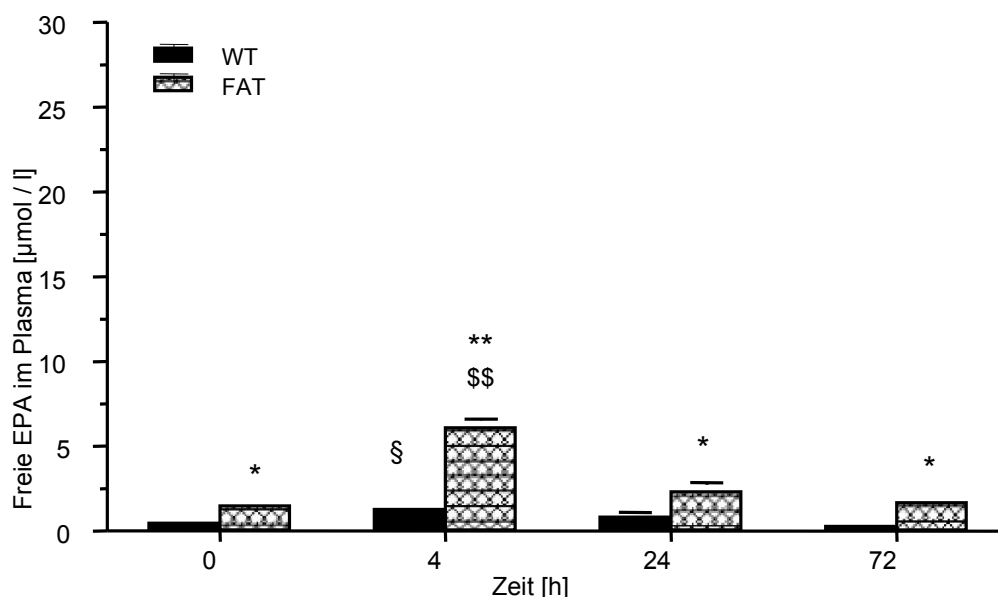


Abbildung 20: Eicosapentaensäure (EPA) im Plasma von WT und Fat-1 Mäusen 0h, 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10 μ g LPS

0h, 4h, 24h und 72h nach Stimulation mit 10 μ g LPS wurde Blut von WT und Fat-1 Mäusen entnommen und die EPA bestimmt. Die Konzentration der EPA unterschied sich bei den beiden Mäusegruppen zu allen Zeitpunkten signifikant. Bei 0h, 24h und

72h mit $p < 0,05$ und bei 4h mit $p < 0,01$ (* und **, $p < 0,05$ und $p < 0,01$). EPA hatte die höchste Konzentration nach 4h in Fat-1 Tieren und unterschied sich zu allen anderen Zeitpunkten signifikant (\$\$, $p < 0,01$ vs. alle anderen Zeitpunkte). Auch bei den WT Mäusen war die höchste Konzentration von EPA bei 4h und unterschied sich von 72h Werten, mit Werten unter dem Ausgangswert, signifikant (§, $p < 0,05$ vs. 72 h).

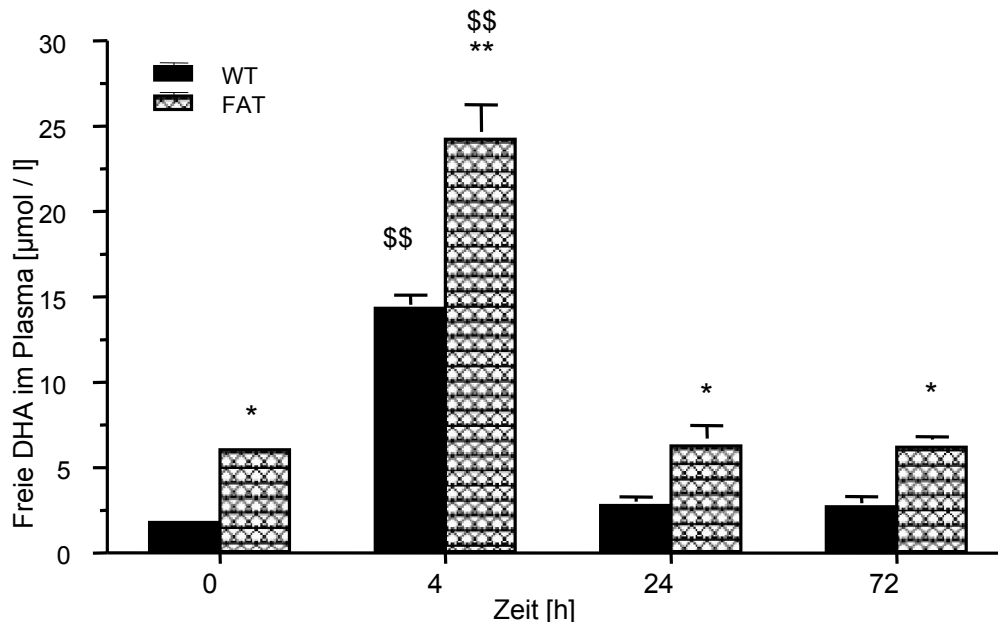


Abbildung 21: Docosahexaensäure (DHA) im Plasma von WT und Fat-1 Mäusen 0h, 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10µg LPS

0h, 4h, 24h und 72h nach Stimulation mit 10µg LPS wurde Blut von WT und Fat-1 Mäusen entnommen und die DHA bestimmt. Konzentrationen von DHA unterschieden sich bei Fat-1 und WT Mäusen zu allen Zeitpunkten signifikant (* und **, $p < 0,05$ und $p < 0,01$). Die DHA hatte bei 4h die höchste Konzentration in WT und Fat-1 Mäusen und unterschied sich signifikant von 0h, 24h und 72h (\$\$, $p < 0,01$ vs. alle anderen Zeitpunkte). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM mit $n = 6-8$ dargestellt.

4.8.3 Verhältnis von AA/(EPA + DHA)

Das Verhältnis unter den Ausgangsbedingungen von AA/(EPA + DHA) war 2,40/1 in WT Mäusen und 0,77/1 in Fat-1 Tieren. Das Verhältnis veränderte sich 4h nach Gabe von LPS zu 1,20/1 in WT Mäusen und 0,30/1 in Fat-1 Mäusen. Nach 24h betrug das Verhältnis in WT Tieren 1,90/1 und in Fat-1 Mäusen 0,29/1. 72h nach LPS-Gabe stiegen die AA Konzentrationen in den WT Mäusen wieder an und führten zu einem Verhältnis von 2,20/1. Die ω -3 Fettsäure Konzentration sank in den Fat-1 Mäusen und zeigte ein Verhältnis von 0,56/1.

4.8.4 Summe aller freien Fettsäuren

Bei der Messung der Summe aller freien Fettsäuren unter Standardbedingungen, d.h. ohne Stimulation von LPS, kam man bei den WT Mäusen auf Konzentrationen von $300,1 \pm 21,7 \mu\text{mol/l}$ im Plasma und zu ähnlichen Werten bei den Fat-1 Mäusen mit $337,5 \pm 22,0 \mu\text{mol/l}$. Freie Fettsäuren stiegen nach 4h um das vierfache in WT Mäusen und erreichten Werte von $1199,3 \pm 41,0 \mu\text{mol/l}$. In Fat-1 Mäusen stiegen die Werte auf $828,5 \pm 51,0 \mu\text{mol/l}$. Dieser Anstieg war in jeder Mausgruppe signifikant. In beiden Gruppen wurden nach 24h die Ausgangswerte wieder erreicht. WT Mäuse hatten Werte von $371 \pm 69,0 \mu\text{mol/l}$, und Fat-1 Mäuse zeigten Konzentrationen von $247,5 \pm 57,0 \mu\text{mol/l}$. 72h nach Stimulation mit LPS hatten sich die Werte wieder auf die Ausgangskonzentrationen normalisiert. In WT Mäusen wurde eine Konzentration von freien Fettsäuren von $295,5 \pm 60,0 \mu\text{mol/l}$ und bei Fat-1 Mäusen von $326,7 \pm 20,0 \mu\text{mol/l}$ gemessen.

Bei 4h unterschieden sich die WT und Fat-1 Mäuse mit den Konzentrationen von FFA signifikant.

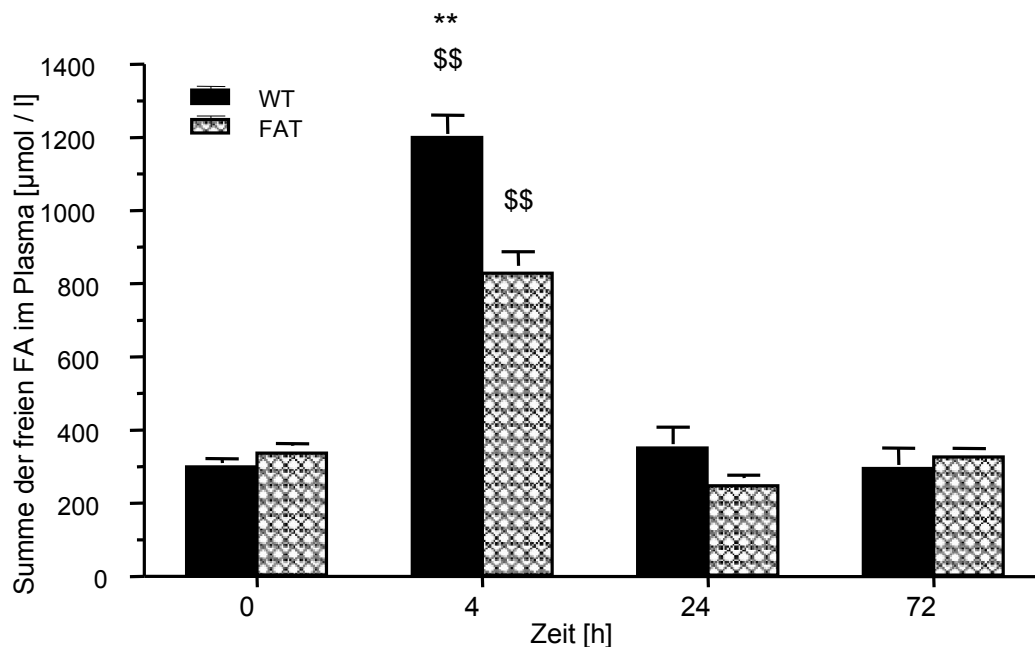


Abbildung 22: Summe der freien Fettsäuren (FFA)

0h, 4h, 24h und 72h nach Stimulation mit $10 \mu\text{g}$ LPS wurde Blut von WT und Fat-1 Mäusen entnommen und die Summe der FFA bestimmt. Die Summe der FFA zeigte bei beiden Mausgruppen fast das gleiche Zeitprofil mit einem Peak bei 4h der sich signifikant zu den 0h, 24h und 72h Werten unterschied (\$\$, $p < 0,01$ vs. alle anderen

Zeitpunkte). Die Fat-1 Mäuse hatten signifikant weniger FFA als WT Mäuse bei 4h (**, $p < 0,01$). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM mit $n = 6-8$ dargestellt.

5. Diskussion

5.1 Das Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte akute Lungenversagen (ALI) in der Maus

Das Modell eines LPS-induzierten akuten Lungenversagens in der Maus ist gut charakterisiert. *Delayre-Orthez et al.* zeigten, dass eine Dosis von 1µg intratracheal (i.t.) instilliertes LPS eine mittelgradige Lungenschädigung hervorruft. Eine Dosis von 10µg LPS intratracheal instilliert bewirkt eine Lungenschädigung schwereren Ausmaßes, wie *Schaefer et al.* in ihren Versuchen demonstrieren konnten [72, 107-109]. In ihren Experimenten wurden die LPS-induzierten proinflammatorischen Zytokine, die alveoläre Leukozytentransmigration und die Permeabilität der Lungengefäße nach intratrachealer Gabe von 1µg und 10µg LPS bei Mäusen gemessen. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede im Ausmaß der Entzündungsreaktion [109].

Szarka et al. zeigten in ihren Versuchen, dass bei einer intranasalen Gabe von 10µg LPS/Maus eine akute Lungenschädigung nach 2-4 Stunden ausgelöst wurde. Eine maximale Schädigung war nach 24-48 Stunden erreicht. Eine Sepsis-ähnliche Antwort wurde bei höheren Dosen von LPS ausgelöst. Außerdem demonstrierte die Arbeitsgruppe, dass gereinigtes LPS aus *E.coli* eine stärkere Immunantwort hervorrief als ein hitzeabgetötetes *E. coli*-Bakterium [72, 108].

In Studien von *Yipp et al.* wurde verdeutlicht, dass neben LPS noch andere Auslöser für ARDS existieren. Die Arbeitsgruppe verglich LPS mit Lipoteichonsäure (LTA), ein Wandbestandteil gram-positiver Bakterien. Zum einen wurde die leukozytäre-endotheliale Interaktion bei lokaler Gabe mittels Intravitalmikroskopie gemessen und zum anderen die Anzahl der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten bei systemischer Gabe. Sie zeigten, dass LPS im Vergleich zu LTA eine systemische Wirkung auf Leukozyten und neutrophile Granulozyten hat. Zudem hatte LPS einen stärkeren lokalen Effekt auf das Leukozytenrollen, die Adhäsion und die Transmigration der Leukozyten ins umliegende Gewebe [72, 110].

In Experimenten von *Nagase et al.* wurde eine akute Lungenschädigung bei Mäusen durch intratracheal instillierte Salzsäure (HCL) ausgelöst. In der broncho-alveolären Lavage wurde vermehrt Protein und Leukozyten gemessen, so dass gezeigt werden

konnte, dass die Mäuse ein Lungenödem und eine akute Lungenschädigung entwickelten. Bei diesem Auslöser für ARDS ist einschränkend zu sagen, dass die Mäuse nur eine Überlebensspanne von zwei bis drei Stunden hatten [72, 111].

In der vorliegenden Arbeit sollte das akute Lungenversagen anhand der Lungenhistologie (Abb. 11), der intraalveolären Leukozyteninvasion (Abb. 12), des Myeloperoxidase-Aktivitäts-Assay aus Lungengewebe (Abb. 13), der Proteinextravasation (Abb. 14), der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (Abb. 15, 16) und der motorischen Aktivität und Körpertemperatur (Abb. 17, 18) der Mäuse untersucht und beurteilt werden. Wie oben beschrieben ist LPS für die Auslösung eines akuten Lungenversagens ein international akzeptierter Stimulus mit reproduzierbarer Wirkung. Die Dosis des Stimulus wurde auf 10µg LPS/Maus festgelegt. Um den Zeitverlauf beurteilen zu können, wurden Werte, neben der Kontrollgruppe, nach 4h, 24h und 72h ermittelt.

Als Einschränkung - im Bezug auf die klinische Wirklichkeit - ist in dieser Studie die durch den Gebrauch des LPS induzierten Modells vorgegebene einmalige Gabe der Noxe zu nennen. Durch diese einmalige Gabe von LPS würde es zu einer eigenständigen Ausheilung der Entzündung kommen. Dies unterscheidet sich von einem Modell, in dem es zu einem durch Bakterien verursachten, in der Klinik ähnlichen, akuten Lungenversagen kommt [112]. Daher ist anzumerken, dass dieses Modell die klinische Realität nur eingeschränkt widerspiegelt.

5.1.1 Ergebnisse des LPS-induzierten akuten Lungenversagens in Wildtyp Mäusen

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit einer intratrachealen Gabe von 10µg LPS eine akute Lungenschädigung hervorgerufen werden kann.

In der Lungenhistologie der WT Mäuse konnten nach Gabe von LPS ein Anstieg der Leukozyten im Alveolarraum und im Interstitium und ein interstitielles Lungenödem beobachtet werden. Es wurden Lungenhistologieschnitte 24 und 72 Stunden nach Applikation von LPS beurteilt. Wie in den Ergebnissen dargestellt, ist eindeutig zu

sehen, dass nach 24h das Wirkungsmaximum noch nicht erreicht war und die Ausprägung der bereits zu sehenden Effekte nach 72h noch verstärkt war (vgl. Abb. 11). Auch an den Ergebnissen der intravasalen Leukozyteninvasion, die anhand der Anzahl der Leukozyten in der BAL gemessen und dann ihre quantitative Zusammensetzung bestimmt wurde, zeigt deutlich, dass LPS eine akute Lungenschädigung verursacht. Die Anzahl der Leukozyten in der BAL stieg nach 24h deutlich an und zeigte eine weitere Zunahme nach 72h (vgl. Abb. 12). Durch die Unterteilung oder Differenzierung der Leukozyten in neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten konnte die Emigration von Granulozyten zum Ort der Entzündung veranschaulicht werden.

Auch die steigende MPO-Aktivität spiegelt die vom LPS ausgelöste Leukozyteninvasion in die Lunge wider, wobei diese zwischen den Zeitpunkten 0h und 24h deutlich gesteigert war, jedoch nach 72h eine geringere Aktivität zu messen war. Der Anstieg der MPO-Aktivität und der Leukozytenzahl in der BAL spiegelt den Vorgang der Leukozytenrekrutierung zum Entzündungsort und Leukozytenwanderung vom Blutgefäß in die Alveolen wider. Der erste Schritt der Leukozytenrekrutierung wird über die Funktionen unterschiedlicher Selektine, die auf Endothelzellen und Leukozyten vorhanden sind, vermittelt, und durch inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α oder LPS induziert [113]. Diese Daten korrelieren mit der Verlagerung der Leukozyten in die Lunge bis 24h nach LPS-Installation. Sobald die Leukozyten in der Mikrozirkulation der Lunge sind, beginnt die Auswanderung der Leukozyten in die Alveolen [113]. In unseren Versuchen erreichte die Leukozytenwanderung und somit die Leukozytenzahl in der BAL ihr Plateau einige Stunden nach dem Peak der MPO-Aktivität, da die MPO-Aktivität nur die Konzentration der Leukozyten in den Lungengefäßen und im Interstitium, nicht aber in den Alveolen, widerspiegelt.

Des Weiteren kam es zu einem vermehrten vaskulären Proteinaustritt durch intratracheale LPS-Gabe, was für eine Schädigung der endothelialen und epithelialen Barriere spricht.

Die Konzentration von TNF- α und MIP-2 - dies sind entzündungsverstärkende Zytokine; MIP-2 wirkt als Chemoattraktants - war 4h nach Stimulation stark angestiegen, sank dann im Verlauf jedoch wieder auf die Ausgangswerte zurück.

Das in dieser Arbeit genutzte Modell entspricht den bisher beschriebenen Daten und ist geeignet für die Untersuchung der Mechanismen des akuten Lungenversagens.

5.2 Auslösung eines Lungenversagens bei Fat-1 Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des veränderten ω -6 zu ω -3 Fettsäureverhältnisses auf die Bildung von verschiedenen Entzündungsparametern, die durch ein akutes, induziertes Lungenversagen bei Fat-1 und Wildtyp Mäusen ausgelöst wurde, untersucht. Die Verwendung von Fat-1 Mäusen kombiniert die Vorteile von einem veränderten Verhältnis der ω -6 zu ω -3 Fettsäuren (2,40/1 in WT und 0,77/1 in Fat-1 Mäusen) mit der Tatsache, keine zusätzlichen Lipide im Rahmen einer Fütterung zuführen zu müssen. Ein exogenes Angebot von Lipiden könnte ein zusätzlicher, die Bildung der Entzündungsparameter beeinflussender Faktor sein, da die orale Aufnahme von Lipiden die Entzündungsantwort über die neuro-endokrine Achse, den Vagusnerv und Acetylcholinrezeptoren auf Leukozyten abschwächen kann [114, 115]. Dies zeigten *Luyer et al.* an einem Versuch mit Ratten, die entweder fettreiche oder fettarme Nahrung bekamen und die teilweise vagotomiert wurden [114].

Außerdem gibt es bei der oralen oder intravenösen Zufuhr der ω -3 Fettsäuren eine Menge an unterschiedlichen Variablen, wie beispielsweise die Verunreinigung der benutzten Lipide, Geschmacksstoffe, Sensibilität zur Oxydierung, Aufbewahrung oder Dauer der Nahrungsumstellung, die alle einen signifikanten Einfluss auf das Fettsäureverhältnis im Körper haben können [116].

Die Fat-1 Mäuse tragen das Fat-1 Gen des *Caenorhabditis elegans* und können so eine zusätzliche Doppelbindung in die Kohlenwasserstoffkette einer ungesättigten Fettsäure einbringen und eine ω -6 Fettsäure in eine ω -3 Fettsäure konvertieren. Daraus resultiert ein Anstieg der ω -3 Fettsäuren in allen Organen und im Gewebe der Fat-1 Mäuse, ohne dass eine Zufuhr von ω -3 Lipiden notwendig ist [99].

5.2.1 Ergebnisse des LPS-induzierten akuten Lungenversagens in Fat-1 Mäusen

Bei den Fat-1 Mäusen konnte ebenso wie bei den WT Mäusen gezeigt werden, dass eine intratracheale Gabe von LPS eine akute Lungenschädigung hervorruft.

In den Lungenhistologieschnitten konnte das vermehrte Vorkommen von Leukozyten im Alveolarraum und im Interstitium sowie das verstärkte Lungenödem gezeigt werden. Nach 72h war der Unterschied deutlicher sichtbar als nach 24h. Die in der

Lungenhistologie dargestellte Leukozytenvermehrung bei einer akuten Lungenschädigung im Alveolarraum wurde anhand der Leukozytenbestimmung in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit bestätigt. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Leukozyten, insbesondere der der neutrophilen Granulozyten, wie im Cytospin gezeigt. Auch die Werte der Myeloperoxidase als Marker für die Gesamtinfiltration der Lunge mit neutrophilen Granulozyten zeigten einen Anstieg über 24h und eine leichte Verminderung nach 72h. Ein Hinweis für die Schädigung der endothelialen-epithelialen Barrierefunktion bei einer akuten Lungenschädigung ist der zunehmende Proteinaustritt, welcher durch die steigende Proteinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit gemessen wurde. Ein weiterer Beweis für die Auslösung eines akuten Lungenversagens in der Fat-1 Maus durch LPS ist der Anstieg der Konzentrationen der Entzündungsmediatoren TNF- α und MIP-2. Die chemoattraktive Wirkungsweise des MIP-2 lockt die Leukozyten zum Ort der Entzündung, in unserem Fall die Lunge, und TNF- α wirkt auf die Schrankenfunktion der Endothelzellen der Gefäße und Alveolarepithelien, wodurch die Leukozytensequestration unterstützt wird [47].

Das in der Arbeit genutzte Modell entspricht auch bei den Fat-1 Mäusen den bisher beschriebenen Daten und ist für die Untersuchung der Mechanismen des akuten Lungenversagens geeignet – besonders im Hinblick auf eine Verschiebung im Fettsäuremuster.

5.3 Unterschiede des LPS-induzierten ALI in WT und Fat-1 Mäusen

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer mit LPS-induzierten Lungenschädigung bei Mäusen mit unterschiedlichem ω -6/ ω -3 Fettsäureverhältnis untersucht. Es konnte eine Verminderung der Schwere des LPS-induzierten akuten Lungenversagens in Fat-1 Mäusen verglichen zu WT Tieren gezeigt werden.

5.3.1 Intrapulmonale Leukozyteninvasion

Beim akuten Lungenversagen kommt es zur intraalveolären Invasion von Leukozyten. In dieser Arbeit wurde anhand der Lungenhistologie, der Leukozytenanzahl in der

broncho-alveolären Lavage sowie in der Myeloperoxidase-Aktivität gezeigt, dass die intrapulmonale Leukozyteninvasion in Fat-1 Mäusen geringer ist als bei den WT Tieren.

Die Arbeitsgruppe um *Schaefer et al.* zeigte bereits, dass die Infiltration von Leukozyten bei Infusionen von auf Fischöl basierten Lipidemulsionen in Mäusen geringer ist. Den Mäusen wurden ω -3 und ω -6 reiche Lipidemulsionen verabreicht. Bei der Gruppe mit erhöhten ω -3 Lipidkonzentrationen war eine deutlich erniedrigte Leukozyteninvasion in die Lunge zu messen [109].

Die Transmigration von Leukozyten durch die endotheliale-epitheliale Barriere ist ein eng regulierter *multi-step* Prozess [117], weshalb dieser komplexe Prozess auf unterschiedlichen Ebenen von Fettsäuren beeinflusst werden kann. *Weber et al.* zeigten z.B., dass es durch eine höhere Konzentration an ω -3 Fettsäuren in der Zellmembran zu einer verminderten Verfügbarkeit von VCAM-1, einem endothelialen Adhäsionsmolekül, kommen kann [118]. Durch eine verringerte Anzahl an Adhäsionsmolekülen können weniger Zellen binden, und es kommt zu einer verringerten Auswanderung von Leukozyten [118]. Außerdem wird der Übergang von der rollenden zur festen Adhäsion von dem Plättchen-aktivierenden Faktor, der von Endothelzellen für Leukozyten präsentiert wird [119], und der Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase gamma in Leukozyten ermöglicht [120]. Beide Vorgänge werden von ω -3 Fettsäuren inhibiert [121, 122], so dass hierdurch die Leukozytentransmigration verringert ist.

Ein weiterer Aspekt, der für die verminderte Leukozyteninvasion in den Alveolarraum in Fat-1 Mäusen verantwortlich sein kann, ist die verminderte Bildung des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2), das Äquivalent der Mäuse zu dem humanen Chemotaxin Interleukin 8 (IL-8), welches die Chemotaxis für Leukozyten bei einer Entzündung fördert [49].

Im Unterschied zu MIP-2 war die TNF- α Konzentration in beiden Mausgruppen in der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Wir vermuten, dass in unserer Aufstellung TNF- α kein entscheidender Faktor ist, der in den unterschiedlichen Auswirkungen der ω -3 Fettsäuren auf Adhäsion und Transmigration involviert ist. In anderen Versuchsanordnungen konnte gezeigt werden, dass die TNF- α Konzentration bei veränderten Fettsäureverhältnissen zugunsten von ω -3 geringer war [109, 123].

5.3.2 Zytokinfreisetzung bei einer akuten Lungenschädigung

In den vorliegenden Experimenten wurden die proinflammatorischen Zytokine MIP-2 und TNF- α als wichtige Indikatoren einer Entzündung gemessen.

Bereits andere Arbeitsgruppen untersuchten den Effekt von unterschiedlichen Fettsäuren im Bezug auf die Zytokinsynthese. *Schäfer et al.* bestimmten proinflammatorische Zytokine in der BAL-Flüssigkeit von Mäusen, die auf ω -3 oder ω -6 basierende Lipidemulsionen infundiert bekamen, und denen durch intratracheale LPS-Instillation ein akutes Lungenversagen verursacht wurde. Die Werte der proinflammatorischen Zytokine stiegen nach Stimulation mit LPS an, sie waren bei Mäusen mit einer auf ω -3 basierenden Lipidemulsion verringert [109].

Die Arbeitsgruppe um *Pleuss et al.* führte Untersuchungen an gesunden Freiwilligen durch. Die eine Gruppe wurde, im Gegensatz zu der Kontrollgruppe, 48 und 24 Stunden vor dem Untersuchungstag mit einer auf ω -3 Fettsäure basierenden Lipidemulsion infundiert. Am Untersuchungstag wurde beiden Gruppen ein Bolus LPS injiziert. Im Plasma der Freiwilligen, denen die ω -3 reiche Lipidemulsion infundiert wurde, konnten niedrigere Werte TNF- α nachgewiesen werden [123].

Die Arbeitsgruppe um *Mayer et al.* führte Untersuchungen an Intensivpatienten durch. 21 Intensivpatienten mit Sepsis wurden über fünf Tage, je nach Studie, entweder mit einer ω -3 reichen Lipidemulsion oder einer konventionellen ω -6 enthaltenden Lipidemulsion infundiert. Um die Zytokinkonzentration von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 zu messen, wurden Monozyten isoliert und mit Endotoxin von *Salmonella typhimurium* stimuliert. Die Zytokine wurden vor Beginn der Infusion und dann täglich bestimmt. Die Ausgangswerte der beiden Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Bereits am zweiten Tag konnte man eine deutliche Differenz der Zytokinsynthese bei den unterschiedlichen Gruppen sehen. Bei den Patienten, die die ω -3 reiche Lipidemulsion erhielten, wurde eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten im Vergleich zu der Gruppe mit ω -6 reicher Lipidemulsion gemessen. Sobald man die parenterale Ernährung auf die konventionelle Infusion (ω -6 reiche Lipidemulsion) umstellte, ging die Zytokinsynthese auf die Ausgangswerte zurück, d.h. es kam wieder zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [124].

Im Gegensatz zu den vorherigen Studien wurde in einer Studie von *Michaeli et al.* jedoch gezeigt, dass eine drei- bis vier-wöchige orale Zufuhr von Fischöl bei gesunden

Freiwilligen keinen signifikanten Unterschied der Zytokinkonzentration im Plasma nach intravenöser LPS-Gabe im Vergleich zu der Kontrollgruppe ergab [125]. Wir vermuten, dass dies ein Teil eines langzeit-kompensations Prozesses ist, der den Auswirkungen einer akuten Intervention mit ω -3 Fettsäuren entgegen wirkt.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied der TNF- α Konzentration zwischen Fat-1 und WT Mäusen gezeigt werden (Abb. 15). In beiden Mausgruppen wurde die gleiche Anfangskonzentration gemessen, ein identischer Anstieg vier Stunden nach Stimulation mit LPS und ein gleiches Absinken der TNF- α Konzentration auf das Ausgangsniveau nach 24 Stunden. Da es wie oben beschrieben einige Studien gibt, in denen die TNF- α Konzentration unter parenteraler Zufuhr von ω -3 Fettsäuren geringer ist, nehmen wir an, dass in unserem Versuchsaufbau TNF- α als proinflammatorisches Zytokin nicht stark involviert ist.

Als weiteres Zytokin wurde MIP-2 in der BAL-Flüssigkeit gemessen. Beide Mauslinien zeigten nach vier Stunden einen Anstieg der Konzentration, jedoch war dieser bei den Fat-1 Mäusen geringer als bei den WT Mäusen (Abb. 16). Nach 24h war die MIP-2 Konzentration in der BAL in beiden Mauslinien wieder auf die Anfangskonzentration zurückgegangen. Interessanterweise war die Ausgangskonzentration von MIP-2 in Fat-1 Mäusen erhöht, parallel zu einer geringeren Leukozytenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Dieser Befund könnte durch einen Adaptationsprozess aufgrund einer reduzierten Migration von Leukozyten in die Alveolen verursacht worden sein.

5.3.3 Proteinkonzentration in der Lavageflüssigkeit im Zusammenhang mit der Bildung von Eicosanoiden

Die Ergebnisse, besonders die der reduzierten Leukozyteninfiltration und der verminderten MIP-2 Konzentration, zeigten eine schwächere Aktivierung der Entzündungsantwort auf intratracheale LPS-Gabe bei den Fat-1 Mäusen. Eine Veränderung der endothelialen-epithelialen Gefäßbarriere kann durch Messung des Proteingehaltes in der broncho-alveolären Lavage (BAL) charakterisiert werden. Befindet sich mehr Protein in der BAL, zeigt dies, dass der Schaden an der alveolo-kapillären Barriere größer ist und es durch die vaskuläre Durchlässigkeit zu einem vermehrten Proteinübertritt und somit zu einer Flüssigkeitsansammlung im Lungengewebe und in den Alveolen kommt. Die Ergebnisse der Proteinkonzentration in

den Alveolen weisen auf eine verbesserte vaskuläre und epitheliale Barrierefunktion in den Fat-1 Mäusen hin (Abb. 14).

Einhergehend zu diesen Ergebnissen zeigt auch die Arbeitsgruppe von *Schäfer et al.* in ihren Experimenten, dass durch Infusion einer auf Fischöl basierten Lipidemulsion in Mäuse die Proteinextravasation bei einem akuten Lungenversagen verringert wurde [109].

Die Verbesserung der kapillären Durchlässigkeit und die verminderte Proteinextravasation durch ω -3 Fettsäuren wurde in unterschiedlichen Modellen des akuten Lungenversagens gefunden. Es wurde gezeigt, dass es mit einer geringeren Bildung von Serie-4 Leukotrienen der AA und der vermehrten Bildung von weniger proinflammatorisch wirkenden Serie-5 Leukotrienen der EPA einherging [109, 126].

Die Arbeitsgruppe um *Grimminger et al.* prüfte in ihren Versuchen, inwieweit die vom Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) ausgelöste Leukotriensynthese durch das Angebot an freien Fettsäuren und den Ersatz von AA durch EPA beeinflusst ist. Diese Experimente wurden an isolierten Kaninchenlungen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass bei Gabe von EPA die geringer proinflammatorisch wirkenden Leukotriene der Serie-5 vermehrt gebildet wurden [126]. Diese Versuche verdeutlichen, dass das Vorhandensein der ω -3 Fettsäuren einen Einfluss auf die Leukotriensynthese hat. Nach der Aktivierung der 5-Lipoxygenase ist die Bildung der Serie-4 und -5 Leukotriene durch die Verfügbarkeit der freien AA oder EPA reguliert [71, 127]. Dies zeigten *Grimminger et al.* in ihren Versuchen, in denen sie den Einfluss von exogen zugeführter AA oder EPA auf den 5-Lipoxygenase Metabolismus in neutrophilen Granulozyten untersuchten. Sie folgerten aus ihren Experimenten, dass die durch inflammatorische Liganden (z.B. PAF) induzierte Eicosanoidsynthese der neutrophilen Granulozyten von der Anwesenheit von freier mehrfach ungesättigter Fettsäure abhängt. Zudem wurde gezeigt, dass EPA der AA vorgezogen wird, d.h. mehr EPA zugehörige Eicosanoide gebildet werden, wenn EPA und AA gleichzeitig gegeben wurden und so im Wettbewerb miteinander standen [71].

Auch in anderen Studien wurde die Bildung von Eicosanoiden im Bezug auf ω -3 und ω -6 Fettsäuren untersucht. *Sperling et al.* zeigten in einer Studie mit acht gesunden Freiwilligen, dass es bei einer Nahrungsergänzung mit ω -3 Fettsäuren zu einer Abschwächung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und einer verminderten Bildung von Leukotrien B₄ (LTB₄) kommt. Die Hälfte der Probanden erhielt EPA in Kapseln zur Einnahme. Drei und zehn Wochen nach Versuchsbeginn wurden die

neutrophilen Granulozyten und die Monozyten aller acht Probanden untersucht. Bei jedem konnte eine verminderte Bildung von LTB₄ gemessen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die LTB₄ stimulierte Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten und die Bildung von Inositoltrisphosphat (IP3) erheblich mit der Anwesenheit von EPA korrelierte [128].

Die Experimente zeigten verringerte Bildung von Eicosanoiden bei einem erhöhten ω -3 Fettsäure-Angebot. Zwei Mechanismen könnten bei diesem Effekt mitgewirkt haben. Zum einen könnte eine reduzierte Verfügbarkeit der AA und eine erhöhte Konzentration der ω -3 Fettsäuren EPA und DHA die Bildung der von der AA abgeleiteten Eicosanoide gesenkt haben. Zum anderen könnten Anstiege der ω -3 Lipide in der Zellmembran Auswirkungen auf lipid-basierten *second messenger* haben wie oben bei den Versuchen von *Sperling et al.* gezeigt. Durch herabgesetzte Metabolisierung von Inositoltrisphosphat (IP3) und durch Phosphatidylinositol (PI) spezifischer Phospholipase C kommt es zur geringeren Aktivierung der Leukotrien A Epoxid-Hydrolase und der Inhibierung der LTB₄ stimulierten Chemotaxis. Es folgt eine abgeschwächte Signalkaskade [128].

Des Weiteren wurden Versuche mit Eicosanoiden im Zusammenhang mit Permeabilität durchgeführt. Die Arbeitsgruppe *Arakawa et al.* machte Versuche mit Thromboxan A₂, welches nach einer Halbwertszeit von 30 Sekunden in das stabile, aber inaktive TxB₂ zerfällt [22]. Es wurde gezeigt, dass die Permeabilität unter Gabe von TxA₂ Rezeptorantagonisten oder Tx-Synthetaseinhibitoren deutlich schwächer war, so dass ein Zusammenhang zwischen TxA₂ und der endothelialen Durchlässigkeit besteht. Ist TxA₂ vermindert, ist die Permeabilität auch geringer [129].

Mit diesen Kenntnissen und dem Wissen, dass TxB₂ bei Fat-1 Mäusen einen wesentlich geringeren Anstieg nach Stimulation der Mäuse mit LPS zeigte als bei WT Tieren [115], kann man darauf schließen, dass die Bildung von Eicosanoiden einen Einfluss auf die epitheliale Barrierefunktion während eines Entzündungsprozesses hat. Bei den Fat-1 Mäusen wurde ein geringerer Anstieg der TxB₂ Konzentration gemessen, die epitheliale Barriere ist nicht so stark beeinträchtigt und die Proteinextravasation ist geringer als bei den WT Mäusen [115].

5.4 Aktivität und Temperatur, besteht ein Zusammenhang mit Resolvinen?

Bei der Durchführung der Versuche fiel auf, dass die Fat-1 Mäuse subjektiv eine erhöhte Aktivität und ein schnelleres Erholen nach der LPS-Gabe zeigten. Um dies auch objektiv beurteilen zu können, wurden die Aktivität und die Körpertemperatur der Fat-1 und WT Mäuse in einer temperaturneutralen Umgebung bestimmt. Dies wurde mit Hilfe eines Transmitters, der sich in der Bauchhöhle der Tiere befand, gemessen. Die thermoregulatorische Antwort auf Entzündung kann sich als Hyper- oder Hypothermie äußern [59]. Hypothermie wird oft als Fehlanpassung gesehen, korrelierend mit einem schlechten Krankheitsverlauf. Die Mortalität von hypothermischen Patienten ist doppelt so hoch wie die von fiebernden Patienten [130]. Fat-1 Mäuse erlangten innerhalb von 24h nach LPS-Gabe ihre normale Körpertemperatur wieder. Dies ist ein eindeutiger Unterschied zu den WT Mäusen, die in den 72h der Beobachtung keine Erholung zeigten (Abb. 18). Die Daten der Körpertemperatur passen mit den Daten der Aktivitätsmessungen der Mäuse zusammen. Bei den Fat-1 Mäusen fand man innerhalb von 48 Stunden nach LPS-Gabe eine unveränderte Tagaktivität, die der WT Mäuse war jedoch reduziert. Die Nachtaktivität dagegen war bei den Fat-1 Mäusen nur leicht, bei den WT Mäusen jedoch stark beeinträchtigt (Abb. 17). Die Ergebnisse der Temperatur- und Aktivitätsmessungen passen zu den anderen gemessenen Entzündungsparametern, die auf eine verminderte Entzündungsantwort und somit auf eine geringere Schädigung der Lunge und eine schnellere Erholung der Fat-1 Mäuse nach LPS-Gabe hinweisen.

Bei den vorliegenden Versuchen ist zu bedenken, dass die Mäuse zur Stimulation mit LPS eine kurze Narkose bekamen, die Einfluss auf die Veränderung der Körpertemperatur der Mäuse hat, da die Körperkerntemperatur durch die Narkosemittel herabgesetzt wird. Da bei den Fat-1 Mäusen eine schnellere Erholung gezeigt werden konnte, kann dies ein Indikator für die protektiven Effekte der ω -3 Fettsäuren sein. Die Fat-1 Tiere erkrankten weniger stark verglichen zu den WT Mäusen, und sie konnten schnell wieder ihr Aktivitätslevel steigern. Die herabgesetzte Aktivität ist ein charakteristischer Bestandteil in der Reihe der zentral kontrollierten Erkrankungsmerkmale, die zusammen als „*sickness behavior*“ bezeichnet werden [131]. Die Versuche machen die Anwendbarkeit und nützlichen Effekte der ω -3 Fettsäuren deutlich. Die schnellere Erholung von der Hypothermie und die reduzierte Minderung

der Aktivität sowie eine verminderte Bildung von MIP-2, der gehemmten und im Endprodukt veränderten Eicosanoidbildung, kann mit der Bildung von Resolvinen oder durch ein vermehrtes Vorhandensein von EPA und DHA erklärt werden. Die Bildung dieser neuen Klasse von aus Eicosapentaensäure und Docosapentaensäure entstehenden Lipidmediatoren wurde bereits in Fat-1 Mäusen [116] und in humanem Blut [89] gezeigt [115]. Resolvine und Protektine sind wirksame, antiinflammatorische Lipidmediatoren, die aus den ω -3 Fettsäuren metabolisiert werden. In den Versuchen von *Hudert et al.* wurde gezeigt, dass ein vermehrter Gehalt an ω -3 Fettsäuren im Gewebe in Fat-1 Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Bildung von antiinflammatorischen Resolvinen führt [116]. Die Synthese von Resolvinen oder die Injektion von Resolvin (Rv)E1 unterstützt und beschleunigt den Rückgang der Entzündung [132, 133]. In Versuchen von *Arita et al.* wurde gezeigt, dass die Gabe von synthetischem RvE1 zu einer verminderten Leukozyteninfiltration bei Mäusen mit durch Zysoman induzierter Peritonitis führt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Überlebensrate, ein stabileres Gewicht der Mäuse und eine reduzierte proinflammatorische Genexpression. Diese Ergebnisse zeigen, dass RvE1 ein wirksamer antiinflammatorischer Lipidmediator ist und für einen Teil der protektiven Wirkungsweise von ω -3 Fettsäuren verantwortlich ist [132]. In einem Mäuse-Modell mit Asthma unterstützten das RvE1 oder Neuroprotektin (NP) D1 den Rückgang der mit Ovalbumin induzierten allergischen Atemwegsentzündung und Überempfindlichkeit [134, 135]. Dies steht im Gegensatz zu den, an diese Arbeit angeschlossenen, Versuche in denen die Bestimmung des RvE1 oder NPD1 in der BAL bei LPS induzierter ALI negativ ausgefallen ist. In Anbetracht, dass *Levy* und *Serhan* über NPD1 in ganzen Mäusungen berichteten [135], könnte die BAL das falsche Medium sein, in welchem man diese Mediatoren sucht [115].

5.5 Verhalten von freien Fettsäuren bei einer Entzündung

Ein Anstieg der freien Fettsäuren im Plasma ist eine generelle Antwort auf schwere Entzündungen und Infektionen [83, 136]. Aufgrund von beschränkten Kohlenhydratvorräten und Glukoseoxidation entsteht ein veränderter Verbrauch und eine veränderte Freisetzung von Substraten, einhergehend mit einer erhöhten

Fettoxidation [115, 137]. Dies zeigten *Stoner et al.* an 27 septischen Patienten im Vergleich zu sieben Patienten ohne Sepsis. Freie Fettsäuren im Plasma sind erhöht und spiegeln die Lipide, die sich während der Langzeit-Ernährung in Fettspeichern gesammelt haben, wider [137].

Mayer et al. führte 2003 eine Studie an Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden durch. Jeweils die Hälfte der beiden Gruppen bekam eine auf ω -3 Fettsäure basierte Lipidemulsion für zehn Tage intravenös, und die andere Gruppe erhielt eine auf ω -6 Fettsäuren basierte Lipidemulsion infundiert. Bei den Probanden mit der auf ω -3 Fettsäuren basierten Lipidemulsion konnte ein rapider Anstieg von freier EPA und DHA gemessen werden. Das ω -6/ ω -3 Verhältnis betrug fast 1/2. Diese Veränderung der FFA im Plasma hatte vor allem Einfluss auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten, welches mit der Bildung von Lipidmediatoren (z.B. Leukotrienen) gemessen wurde [83].

In den vorliegenden Experimenten konnte durch Messung der freien Fettsäuren im Plasma das Verhältnis der ω -6 und ω -3 Fettsäuren zueinander in den verschiedenen Gruppen bestimmt werden. In den WT Mäusen war das Ausgangsverhältnis von ω -6/ ω -3 2,40/1, was sich deutlich von dem der Fat-1 Mäuse mit 0,77/1 unterschied. Bei den Fat-1 Mäusen wurde ein doppelt so hoher Anteil an ω -3 Fettsäure im Plasma gemessen als bei den WT Mäusen. Vier Stunden nach Induktion von einer akuten Lungenschädigung ist der Anteil an ω -3 Fettsäuren in Fat-1 Mäusen fast viermal höher als bei den WT Mäusen.

In unterschiedlichen Studien wurde gezeigt, dass ω -3 Fettsäuren starke immunmodulatorische Wirkungen aufweisen. Dies wurde mit der Bildung von unterschiedlichen Eicosanoiden, den intrazellulären Signalwegen, der Aktivität der Transkriptionsfaktoren und der Genexpression gemessen. Diese Untersuchungen bewiesen, dass eine ausgewogene Ernährung mit einem ω -6/ ω -3 Verhältnis von ungefähr 1-4/1 statt 16-20/1, wie es zurzeit in der westlichen Diät üblich ist, angestrebt werden sollte [63].

Die Ernährung der Menschen hat sich verändert und hat sich von einem hohen Gehalt an ω -3 Fettsäuren (z.B. Leinsamen, Raps- und Sojaöl, sowie Fische v.a. Hering, Lachs, Makrele) zu einem reduziertem Angebot von ω -3 und einer erhöhten Aufnahme von ω -6 Fettsäuren (z.B. Diestelöl oder Sonnenblumenöl, Fleisch) verlagert. Daher hat sich möglicherweise die generelle Reaktion auf Entzündungsvorgänge geändert [63].

5.6 Parenterale Ernährung bei Intensivpatienten mit Lipidemulsionen

Die physiologische Form der Ernährung stellt die enterale Kalorienzufuhr dar. Sie erhält die Struktur und Funktion der Darmzotten und verbessert die lokale Immunität im Darm [138]. Bei Intensivpatienten ist eine enterale Ernährung aus verschiedenen Gründen nicht immer durchführbar oder im Bezug der benötigten Kalorienzufuhr nicht ausreichend. Die enterale Ernährung ist z.B. durch Diagnostik, chirurgische Eingriffe oder ständiges Erbrechen unterbrochen. Kontraindikationen für enterale Ernährung wären schwere Diarrhoe oder eine Minderdurchblutung des Gastrointestinaltraktes. In solchen Fällen wird die alleinige oder zusätzliche parenterale Ernährung empfohlen [139]. Lipidinfusionen stellen eine entscheidende Säule der parenteralen Ernährung dar. Im Gegensatz zu der früher verwendeten Glukose sind sie gute Kalorienträger, die Quelle essentieller Fettsäuren und Phospholipide. Sie stellen das Struktursubstrat für die Zellmembranen und sind Präkursoren für Lipidmediatoren. Sie reduzieren die Liponeogenese, verhindern die Entstehung einer Fettleber und reduzieren das Auftreten von Hyperglykämien [139, 140].

Die ersten Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung waren aus Sojabohnenöl hergestellt, die hohe Konzentrationen an Linolsäure und α -Linolensäure enthielten. Sie waren nicht glukosehaltige Energielieferanten und stellten essentielle Fettsäuren und die Vitamine E und K bereit. In den 70er und 80er Jahren des 20ten Jahrhunderts wurde in Studien herausgefunden, dass die Infusion von auf Sojabohnen basierte Lipidemulsion mit immunologischen Reaktionen einhergeht, die für das Entzündungsgeschehen von Nachteil sind, wie z.B. eine reduzierte Migration und Phagozytose der Granulozyten und damit eine erhöhte Gefahr der Infektion und Sepsis darstellen. Sojabohnenöl enthält eine hohe Konzentration an ω -6 Fettsäuren, wie z.B. AA. Hieraus können proinflammatorische Eicosanoide metabolisiert werden, welche die inflammatorische Antwort regulieren [139]. Mit diesen Erkenntnissen kann man darauf schließen, dass Lipidemulsionen nicht nur bei der Ernährung Anwendung finden, sondern auch eine pharmakologische Beeinflussung des Immunsystems bewirken.

Gogos et al. zeigten in einer Studie mit unterernährten schwerkranken Patienten den Unterschied verschiedener Lipidemulsionen auf die Bildung von TNF- α . Die Gruppe der Patienten, die auf Sojabohnenöl basierte Lipidemulsionen erhielten, hatte einen

signifikanten Anstieg von TNF- α im Vergleich zu der Gruppe mit einer Lipidemulsion aus Sojabohnenöl und mittelkettigen Fettsäuren [141].

Wichmann et al. zeigten, dass sich bei Patienten, die nach einem chirurgischen Eingriff mehr fischölbasierte Lipidemulsionen bekamen, die Leukotriensynthese von LTB₄ zu dem weniger proinflammatorischen LTB₅ verschob [142]. Diese Veränderung ging mit der verminderten Konzentration der proinflammatorischen Mediatoren Interleukin 6 und TNF- α einher [143].

Die Gruppe um *Gadek et al.* untersuchte Patienten mit Sepsis und ernährte eine Gruppe mit Eicosapentaensäure (EPA) und Gammalinolensäure (GLA). Die Kontrollgruppe erhielt eine isokalorische Standardernährung. Die günstigen Auswirkungen der Ernährung mit EPA und GLA zeigten sich in der reduzierten Neutrophilenrekrutierung, dem verbesserten Gasaustausch, dem verringerten Bedarf an mechanischer Beatmung und der verkürzten Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation sowie dem verminderten Auftreten von erneutem Organversagen [96]. Eine schnellere Reduktion des Leukotrien- und Proteineinstroms in den Alveolarraum wurde bei Patienten mit einer akuten Lungenschädigung gezeigt [144].

Im Gegensatz dazu wurde von *Rice et al.* eine Studie an septischen Patienten durchgeführt, die zeigte, dass eine zweimal täglich enterale ω -3 Fettsäuregabe sich nicht positiv auf den Krankheitsverlauf der Patienten auswirkte. Es kam zu schwereren gastrointestinalen Erkrankungen und verlängerten Beatmungszeiten [145]. Eine mögliche Erklärung für diese, zu den anderen Studien abweichenden Ergebnisse, kann der unterschiedliche Ernährungsrythmus sein. Bei *Rice et al.* wurde die ω -3 Fettsäure zweimal täglich im Bolus gegeben, im Gegensatz zur kontinuierlichen enteralen Ernährung mit ω -3 Fettsäuren in den anderen Studien. Hinzu kommt, dass es bei der Bolusgabe zu kurzfristig hohen Fettkonzentrationen kommt, was Diarrhoen begünstigen kann. Zudem wurden in der Studie von *Rice et al.* auch Patienten mit eingeschlossen, die aufgrund ihres Allgemeinzustandes die Infusionsrate evtl. nicht vertragen konnten. Solche Patienten wurden in den anderen Studien nicht mit eingeschlossen. In der Studie von *Rice et al.* wurde als Kontrollsubstrat eine isokalorische kohlenhydrathaltige Ernährung verwendet im Vergleich zu einer ω -6 oder ω -9 haltigen Lipidemulsion in den vorherigen Studien. Es wird vermutet, dass die ω -6 Fettsäuren einen proinflammatorischen Effekt haben und so die Ergebnisse der ω -3 Fettsäuren im Vergleich besser waren [145].

In den vorliegenden experimentellen Beobachtungen wurde gezeigt, dass es zu einer verminderten Leukozytenextravasation (Abb. 12), einem verminderten Proteinaustritt aus den Alveolen (Abb. 14) und einer reduzierten Zytokinbildung (Abb. 15, 16) in Fat-1 Mäusen kam. Aufgrund des Vorteils der vorliegenden Arbeit, dass nicht mit enteraler Ernährung eine Veränderung des ω -6/ ω -3 Verhältnisses hervorgerufen wird, sondern es durch genetische Veränderungen der Mäuse besteht, ist die Verträglichkeit der Lipidemulsionen und der Unterschied bzgl. Bolus- oder kontinuierlicher Gabe nicht von Bedeutung. Die Kontrollgruppe wurde mit der gleichen Nahrung wie die Fat-1 Mäuse ernährt, so dass man keine zusätzliche Gabe von ω -6 Fettsäuren hat. Somit kann man daraus schließen, dass ein in Richtung der ω -3 Fettsäuren verschobenes ω -6/ ω -3 Fettsäureverhältnis einen positiven Einfluss auf den Verlauf von ARDS hat ohne den Einfluss der enteralen Ernährung zu haben. Aufgrund der Daten der klinischen Studien und den experimentellen Nachweisen sollte die Aufnahme von ω -3 Lipiden in die parenterale Ernährung von Patienten, die unter einer akuten Lungenschädigung oder Sepsis leiden, bedacht werden. Die Wahl der mit der Ernährung gelieferten Lipide kann auf das Plasmaprofil der Fettsäuren [83], Lipidmediatoren [127] und die Lungenschädigung [126] Einfluss haben. Somit könnten andere Parameter, wie zuvor beschrieben, bei Patienten beeinflusst werden. Dies könnte helfen, die Patienten im Falle einer schweren Erkrankung optimal mit Hilfe der Ernährung zu unterstützen.

6. Fazit

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell ist aufgrund der Art der Zuführung der ω -3 Fettsäuren nicht vollständig mit der Situation von Patienten mit ARDS vergleichbar. Es liefert aber eine gute Aussagekraft über den Einfluss eines veränderten ω -6/ ω -3 Verhältnisses.

Wir zeigen hier zum ersten Mal, dass Fat-1 Mäuse mit einem reduzierten ω -6/ ω -3 Verhältnis, verglichen mit den WT Mäusen mit einem hohen ω -6/ ω -3 Verhältnis, weniger empfänglich für eine akute Lungenschädigung sind. Das ω -6/ ω -3 Verhältnis der WT Mäuse ist dem Verhältnis ähnlich, das Patienten auf Intensivstationen über eine parenterale Ernährung angeboten wird. Möglicherweise könnte eine veränderte Ernährung für Intensivpatienten mit akutem Lungenversagen, die die physiologische Verfügbarkeit der ω -3 Fettsäuren erhöht, eine positive Auswirkung auf den Krankheitsverlauf haben. Hierzu sind klinische Studien nötig um diesbezüglich eine Aussage treffen zu können.

7. Zusammenfassung

Das Verhältnis von ω -6/ ω -3 Fettsäuren in der Ernährung ist physiologisch von großer Bedeutung. Dies ist die erste Arbeit, die die Auswirkungen von unterschiedlichen ω -6/ ω -3 Fettsäureverhältnissen in transgenen Mäusen verglichen mit Wildtyp Mäusen auf eine induzierte akute Lungenschädigung untersucht. Die vorliegenden tierexperimentellen Daten liefern erste Hinweise, dass eine Veränderung des Fettsäureverhältnisses zugunsten von ω -3 zu einer geringer ausgeprägten Entzündungsreaktion und einer schnelleren Erholung der Mäuse von der Infektion führt. Es scheint, als würden die ω -3 Fettsäuren einen antiinflammatorischen Effekt ausüben. Dies zeigten insbesondere die Ergebnisse der Lungenhistologie und die Leukozytenanzahl in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit. Die verminderte Zytokinproduktion sowie die schnellere Erholung der Fat-1 Mäuse, wie im Verlauf der Körpertemperatur und motorischen Aktivität der Mäuse gezeigt, sind Hinweise auf die verminderte Entzündungsreaktion bei Fat-1 Mäusen bei einer LPS-induzierten akuten Lungenschädigung.

Intensivpatienten werden weltweit mit Lipidemulsionen mit einem hohen ω -6/ ω -3 Verhältnis ernährt. Möglicherweise könnte sich die Gabe von ω -3 positiv auf den Krankheitsverlauf, beispielsweise eines akuten Lungenversagens, bei Intensivpatienten auswirken. Zu diesem Thema müssten zukünftig klinische Studien erfolgen, um die Aussage des Versuchsmodells für die Intensivmedizin bestätigen zu können.

8. Summary

The ratio of ω -6/ ω -3 fatty acids in a diet is of significant importance physiologically. This is the first paper that investigates the effects of different ω -6/ ω -3 fatty acid ratios in transgenic mice compared to wildtype mice with induced acute lung injury. The present animal experiment-gathered data provide initial evidence according to which a change in the fatty acid ratio in favor of ω -3 leads to a less pronounced inflammatory response as well as a faster recovery of mice from the infection. The ω -3 fatty acids seemingly exert an anti-inflammatory effect. This has been shown in the results of the histology of the lung tissue and in the leukocyte count in broncho-alveolar lavage fluid. The decreased cytokine production and faster recovery of fat-1 mice, as shown in the course of locomotor activity as well as body temperature of the mice, are references to the reduced inflammatory response in fat-1 mice in the presence of an LPS-induced acute lung injury.

Around the world intensive care unit patients are nourished with lipid emulsions with a high ratio of ω -6/ ω -3. It is deemed possible that the administration of ω -3 could have a positive effect on disease progression, such as acute lung injury in critically ill patients. In future clinical trials should be undertaken on this topic in order to make an affirmative statement for intensive care.

9. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ALI	<i>acute lung injury</i> (akute Lungenschädigung)
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> (akutes Lungenversagen)
AT II	Alveolarepithelzellen Typ II
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BAL	Broncho–alveoläre Lavage
BLT1	Leukotrien B ₄ Rezeptor 1
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenprotein auf Zellen)
ChemR23	Chemokin-Rezeptor 23
COX	Cyclooxygenase
CXCR2	CXC-Chemokinrezeptor-2
DC	Dünnschichtchromatographie
DD	<i>Death Domaine</i> (Todesdomäne)
DGLA	Dihomogammalinolensäure
DHA	Docosahexaensäure
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (extrazelluläre signalregulierte Kinase)
FA	Fettsäure

FADD	<i>Fas-associated death domain</i> (Fas-assozierte Todesdomäne)
FAME	Fettsäuremethylester
FFA	freie Fettsäure
FID	Flammenionisationsdetektor
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
GC	Gaschromatographie
GLA	Gammalinolensäure
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HEPE	Hydroxyeicosapentaensäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPEPE	Hydroxyperoxyeicosapentaensäure
HPETE	Hydroxyperoxyeicosatetraensäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
HUVEC	<i>human umbilical venous endothelial cell</i> (Endothelzelle einer humanen Nabelschnurvene)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IκB	Inhibitor κB
IL	Interleukin
IP	Inositolphosphat
IRAK	IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mCD 14	membranständiges CD 14

MD-2	<i>Myeloid differentiation-2</i> (Myeloid Differenzierung-2)
min.	Minuten
MIP-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2
mOD-Wert	<i>middle optic density</i> (Wert der mittleren optischen Dichte)
MPO	Myeloperoxidase
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
MyD 88	Myeloid-Differenzierungsfaktor 88
NF-κB	nukleärer Faktor-κB
NP	Neuroprotektin
ω-3	omega-3
ω-6	omega-6
p.a.	<i>pro analysi</i> (Reinheitsbezeichnung für besonders reine Chemikalien)
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> (vom Plättchen abstammender Wachstumsfaktor)
PG	Prostaglandin
PGI	Prostazyklin
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipase
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
RM-ANOVA	<i>repeat measure two-way analysis of variance</i> (Varianzanalyse mit Messwiederholungen)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Rv	Resolvin
s.c.	subkutan
sCD 14	<i>soluble</i> (lösliches) CD 14
sec.	Sekunden

SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i> (TNF- α konvertierendes Enzym)
TIR	Toll-Interleukin 1 Rezeptor
TLR 4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor- α
TNF-R	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Todesdomänen Protein
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
Tx	Thromboxan
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i> (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
v/v	Volumen/Volumen
V/Q	Ventilations-Perfusions-Verhältnis
WT	Wildtyp

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: LPS induzierte Signaltransduktion	7
Abbildung 2: Die Adhäsionskaskade: Kontakte zwischen Leukozyten und Endothelzellen	9
Abbildung 3: Arachidonsäure	19
Abbildung 4: Darstellung der Metabolisierung der Arachidonsäure (AA).	21
Abbildung 5: Eicosapentaensäure	22
Abbildung 6: Docosahexaensäure	22
Abbildung 7: Darstellung der Metabolisierung der Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure	24
Abbildung 8: Abstrakte Darstellung der Synthese der Resolvine	28
Abbildung 9: Resolvin E1 und sein Rezeptor	29
Abbildung 10: Fettsäure-Standard-Mix	52
Abbildung 11: Lungenhistologieschnitte von WT und Fat-1 Mäusen vor, 24h und 72h nach der induzierten akuten Lungenschädigung	56
Abbildung 12: Leukozyten in der BAL bei WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Gabe und 4h, 24h und 72h nach LPS-Gabe	58
Abbildung 13: MPO-Aktivität bei WT und Fat-1 Mäusen vor Stimulation mit LPS und 4h, 24h und 72h nach 10µg intratrachealer LPS-Gabe	61
Abbildung 14: Proteinaustritt bei akuter Lungenschädigung bei WT und Fat-1 Mäusen vor Stimulation mit LPS und 4h, 24h und 72h nach 10µg intratrachealer LPS-Gabe	63
Abbildung 15: TNF- α Konzentration bei WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Gabe und 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10µg LPS	65
Abbildung 16: MIP-2 Konzentrationen bei WT und Fat-1 Mäusen vor LPS-Gabe und 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10µg LPS	66
Abbildung 17 a) und b): Motorische Tag- und Nachtaktivität von WT und Fat-1 Mäusen	69
Abbildung 18 a) und b): Körpertemperatur über Tag und Nacht bei WT und Fat-1 Mäusen	72
Abbildung 19: Konzentration von Arachidonsäure in WT und Fat-1 Mäusen bei 0h, 4h, 24h und 72h	74

Abbildung 20: Eicosapentaensäure (EPA) im Plasma von WT und Fat-1 Mäusen 0h, 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10µg LPS	75
Abbildung 21: Docosahexaensäure (DHA) im Plasma von WT und Fat-1 Mäusen 0h, 4h, 24h und 72h nach intratrachealer Stimulation mit 10µg LPS	76
Abbildung 22: Summe der freien Fettsäuren (FFA)	77

11. Formeln

CHCl_3	Chloroform
CO	Kohlenmonoxid
H_2	Wasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2SO_4	Schwefelsäure
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
MeOH	Methanol
N_2	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaN_3	Natriumazid
NO_2	Stickstoffdioxid

12. Literaturverzeichnis

1. Wheeler, A.P. and G.R. Bernard, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review*. Lancet, 2007. 369(9572): p. 1553-64.
2. Herold, G., *Innere Medizin*. 2005, Herold.
3. Verbrugge, S.J., V. Sorm, and B. Lachmann, *Mechanisms of acute respiratory distress syndrome: role of surfactant changes and mechanical ventilation*. J Physiol Pharmacol, 1997. 48(4): p. 537-57.
4. Rice, T.W., et al., *Comparison of the SpO₂/FIO₂ ratio and the PaO₂/FIO₂ ratio in patients with acute lung injury or ARDS*. Chest, 2007. 132(2): p. 410-7.
5. Bernard, G.R., et al., *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. 149(3 Pt 1): p. 818-24.
6. Neff, M.J., *The epidemiology and definition of the acute respiratory distress syndrome*. Respir Care Clin N Am, 2003. 9(3): p. 273-82.
7. Brun-Buisson, C., et al., *Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study*. Intensive Care Med, 2004. 30(1): p. 51-61.
8. Esteban, A., et al., *Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study*. JAMA, 2002. 287(3): p. 345-55.
9. Villar, J., et al., *Ventilator-induced lung injury and sepsis: two sides of the same coin?* Minerva Anesthesiol. 77(6): p. 647-53.
10. Matthay, M.A. and G.A. Zimmerman, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. 33(4): p. 319-27.
11. Gunther, A., et al., *Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome*. Respir Res, 2001. 2(6): p. 353-64.
12. Walmrath, D., et al., *Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs*. J Appl Physiol, 1993. 74(4): p. 1972-80.
13. Walmrath, D., et al., *Synergism of alveolar endotoxin "priming" and intravascular exotoxin challenge in lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 154(2 Pt 1): p. 460-8.
14. Seeger, W. and H.G. Lasch, *Septic lung*. Rev Infect Dis, 1987. 9 Suppl 5: p. S570-9.
15. Orme, J., Jr., et al., *Pulmonary function and health-related quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(5): p. 690-4.
16. Bannerman, D.D. and S.E. Goldblum, *Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. 284(6): p. L899-914.
17. Dauphinee, S.M. and A. Karsan, *Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells*. Lab Invest, 2006. 86(1): p. 9-22.
18. Ardit, M., et al., *Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14*. Infect Immun, 1993. 61(8): p. 3149-56.
19. Han, S.J., et al., *Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)*. J Biol Chem, 2002. 277(47): p. 44715-21.

20. Poynter, M.E., C.G. Irvin, and Y.M. Janssen-Heininger, *A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation*. J Immunol, 2003. 170(12): p. 6257-65.
21. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/immunity/IS-A01E.html>.
22. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. 2002: Thieme.
23. Kasama, T., et al., *Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. 4(3): p. 273-9.
24. Driscoll, K.E., et al., *Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment*. Environ Health Perspect, 1997. 105 Suppl 5: p. 1159-64.
25. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: p. 469-99.
26. http://de.wikipedia.org/wiki/Neutrophiler_Granulozyt.
27. <http://www.mpi-muenster.mpg.de/nvz/Abb1.jpg>.
28. Luscinskas, F.W., et al., *L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro*. J Immunol, 1996. 157(1): p. 326-35.
29. Aukland, K. and R.K. Reed, *Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume*. Physiol Rev, 1993. 73(1): p. 1-78.
30. Ganter, C.C., S.M. Jakob, and J. Takala, *Pulmonary capillary pressure. A review*. Minerva Anesthesiol, 2006. 72(1-2): p. 21-36.
31. Parker, J.C. and M.I. Townsley, *Evaluation of lung injury in rats and mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. 286(2): p. L231-46.
32. Herzog, E.L., et al., *Knowns and unknowns of the alveolus*. Proc Am Thorac Soc, 2008. 5(7): p. 778-82.
33. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 291(3): p. H985-1002.
34. Seeger, W. and N. Suttorp, *Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins*. Am Rev Respir Dis, 1987. 136(2): p. 462-6.
35. de Gruyter, W., *Pschyrembel*, ed. 259. 2001.
36. Tonks, A.J., et al., *Regulation of platelet-activating factor synthesis in human monocytes by dipalmitoyl phosphatidylcholine*. J Leukoc Biol, 2003. 74(1): p. 95-101.
37. Bhatia, M. and S. Moochhala, *Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome*. J Pathol, 2004. 202(2): p. 145-56.
38. Foex, B.A. and M.P. Shelly, *The cytokine response to critical illness*. J Accid Emerg Med, 1996. 13(3): p. 154-62.
39. Hack, C.E., L.A. Aarden, and L.G. Thijs, *Role of cytokines in sepsis*. Adv Immunol, 1997. 66: p. 101-95.
40. James, M.J., R.A. Gibson, and L.G. Cleland, *Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production*. Am J Clin Nutr, 2000. 71(1 Suppl): p. 343S-8S.
41. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 280(4): p. C719-41.
42. Puneet, P., S. Moochhala, and M. Bhatia, *Chemokines in acute respiratory distress syndrome*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 288(1): p. L3-15.
43. Mukhopadhyay, S., J.R. Hoidal, and T.K. Mukherjee, *Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology*. Respir Res, 2006. 7: p. 125.

44. O'Dea, K.P., et al., *Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(9): p. 1119-27.
45. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. 10(1): p. 45-65.
46. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. 296(5573): p. 1634-5.
47. Bone, R.C., *Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation*. Crit Care Med, 1996. 24(1): p. 163-72.
48. Palluy, O., et al., *Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion*. Free Radic Biol Med, 1992. 13(1): p. 21-30.
49. Wolpe, S.D., et al., *Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(2): p. 612-6.
50. Nguyen-Jackson, H., et al., *STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction*. Blood. 115(16): p. 3354-63.
51. Huang, C., K. Jacobson, and M.D. Schaller, *MAP kinases and cell migration*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 20): p. 4619-28.
52. Groeneveld, A.B., *Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. Vascu Pharmacol, 2002. 39(4-5): p. 247-56.
53. Golenhofen, K., *Physiologie heute*. Vol. 2. 2000: Urban und Fischer. 571.
54. Golenhofen, K., *Physiologie heute*. 2000.
55. Guenard, H., *[Pulmonary ventilation/perfusion ratio]*. J Physiol (Paris), 1987. 82(2): p. 160-71.
56. Herold, G., *Innere Medizin*. 2009, Herold. p. 306-317.
57. Roth, J., et al., *Molecular aspects of fever and hyperthermia*. Neurol Clin, 2006. 24(3): p. 421-39, v.
58. Banks, W.A., A.J. Kastin, and R.D. Broadwell, *Passage of cytokines across the blood-brain barrier*. Neuroimmunomodulation, 1995. 2(4): p. 241-8.
59. Romanovsky, A.A., et al., *Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions*. Front Biosci, 2005. 10: p. 2193-216.
60. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 2001: Springer.
61. Mayer, K., M.B. Schaefer, and W. Seeger, *Fish oil in the critically ill: from experimental to clinical data*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. 9(2): p. 140-8.
62. Bulger, E.M. and R.V. Maier, *Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness*. Crit Care Med, 2000. 28(4 Suppl): p. N27-36.
63. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases*. J Am Coll Nutr, 2002. 21(6): p. 495-505.
64. Heller, A. and T. Koch, *[Pharmacologic aspects of polyunsaturated fatty acids in parenteral nutrition]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 1998. 33(2): p. 77-87.
65. Morita, I., *Distinct functions of COX-1 and COX-2*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 165-75.
66. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB J, 1998. 12(12): p. 1063-73.
67. Heller, A., et al., *Lipid mediators in inflammatory disorders*. Drugs, 1998. 55(4): p. 487-96.

68. Holtzman, M.J., *Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease.* Am Rev Respir Dis, 1991. 143(1): p. 188-203.
69. Weller, P.F., et al., *Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(24): p. 7626-30.
70. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases.* Am J Clin Nutr, 2006. 83(6 Suppl): p. 1505S-1519S.
71. Grimminger, F., U. Durr, and W. Seeger, *Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series leukotrienes in human neutrophils: critical dependence on exogenous free fatty acid supply.* Mol Pharmacol, 1992. 41(4): p. 757-66.
72. Ott, J.R., *Einfluss von n-3-versus n-6-basierten Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung auf den Verlauf eines akuten Lungenversagens der Maus.* 2008.
73. Calder, P.C., *Immunomodulation by omega-3 fatty acids.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2007. 77(5-6): p. 327-35.
74. Yaqoob, P. and P.C. Calder, *Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms.* Br J Nutr, 2007. 98 Suppl 1: p. S41-5.
75. Shapiro, A.C., D. Wu, and S.N. Meydani, *Eicosanoids derived from arachidonic and eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferative response.* Prostaglandins, 1993. 45(3): p. 229-40.
76. Serhan, C.N., *Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. 8(2): p. 115-21.
77. Barham, J.B., et al., *Addition of eicosapentaenoic acid to gamma-linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans.* J Nutr, 2000. 130(8): p. 1925-31.
78. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors.* J Biol Chem, 2007. 282(16): p. 11613-7.
79. Hoherl, K., et al., *Activation of the PGI(2)/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock.* Hypertension, 2008. 52(2): p. 330-5.
80. Malmsten, C.L., *Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes in inflammation.* Am J Med, 1986. 80(4B): p. 11-7.
81. Calder, P.C., S.J. Bevan, and E.A. Newsholme, *The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism.* Immunology, 1992. 75(1): p. 108-15.
82. Grimm, H., et al., *Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes.* Br J Nutr, 2002. 87 Suppl 1: p. S59-67.
83. Mayer, K., et al., *Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation.* Intensive Care Med, 2003. 29(9): p. 1472-81.
84. Kramer, H.J., et al., *Fish oil fatty acids and human platelets: dose-dependent decrease in dienoic and increase in trienoic thromboxane generation.* Biochem Pharmacol, 1996. 52(8): p. 1211-7.
85. Serhan, C.N., et al., *Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals.* J Exp Med, 2002. 196(8): p. 1025-37.
86. Serhan, C.N., et al., *Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via*

- cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing*. J Exp Med, 2000. 192(8): p. 1197-204.
87. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(5): p. 349-61.
 88. Haworth, O. and B.D. Levy, *Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation*. Eur Respir J, 2007. 30(5): p. 980-92.
 89. Hong, S., et al., *Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation*. J Biol Chem, 2003. 278(17): p. 14677-87.
 90. Marcheselli, V.L., et al., *Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression*. J Biol Chem, 2003. 278(44): p. 43807-17.
 91. Flower, R.J. and M. Perretti, *Controlling inflammation: a fat chance?* J Exp Med, 2005. 201(5): p. 671-4.
 92. Bannenberg, G.L., et al., *Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins*. J Immunol, 2005. 174(7): p. 4345-55.
 93. Hasturk, H., et al., *Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo*. J Immunol, 2007. 179(10): p. 7021-9.
 94. Despopoulos, A.S., *Taschenatlas Physiologie*. 2007: Thieme.
 95. Mayer, K., et al., *Short-time infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans*. J Immunol, 2003. 171(9): p. 4837-43.
 96. Gadek, J.E., et al., *Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group*. Crit Care Med, 1999. 27(8): p. 1409-20.
 97. Singer, P., et al., *Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury*. Crit Care Med, 2006. 34(4): p. 1033-8.
 98. <http://www.wikipatents.com/ca/2439654.html>.
 99. Kang, J.X., et al., *Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids*. Nature, 2004. 427(6974): p. 504.
 100. Andonegui, G., et al., *Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs*. J Clin Invest, 2003. 111(7): p. 1011-20.
 101. Bauer, P., et al., *Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. 278(5): p. R1140-7.
 102. Bühling, K.J., *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2004.
 103. Nauseef, W.M., *Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency*. J Mol Med, 1998. 76(10): p. 661-8.
 104. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. 115(1): p. 1-20.
 105. Driscoll, K.E., *Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation*. Exp Lung Res, 1994. 20(6): p. 473-90.

106. Hubschle, T., et al., *Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. 290(1): p. R180-7.
107. Delayre-Orthez, C., et al., *PPARalpha downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse*. Respir Res, 2005. 6: p. 91.
108. Szarka, R.J., et al., *A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation*. J Immunol Methods, 1997. 202(1): p. 49-57.
109. Schaefer, M.B., et al., *Immunomodulation by n-3- versus n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury--role of platelet-activating factor receptor*. Crit Care Med, 2007. 35(2): p. 544-54.
110. Yipp, B.G., et al., *Profound differences in leukocyte-endothelial cell responses to lipopolysaccharide versus lipoteichoic acid*. J Immunol, 2002. 168(9): p. 4650-8.
111. Nagase, T., et al., *Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice*. J Clin Invest, 1999. 104(8): p. 1071-6.
112. Li, Y. and H. Wei, *Lipopolysaccharide "two-hit" induced refractory hypoxemia acute respiratory distress model in rats*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009. 29(4): p. 470-5.
113. Asti, C., et al., *Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage*. Pulm Pharmacol Ther, 2000. 13(2): p. 61-9.
114. Luyer, M.D., et al., *Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve*. J Exp Med, 2005. 202(8): p. 1023-9.
115. Mayer, K., et al., *Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. 179(6): p. 474-83.
116. Hudert, C.A., et al., *Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(30): p. 11276-81.
117. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(9): p. 678-89.
118. Weber, C., et al., *Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. 15(5): p. 622-8.
119. Zimmerman, G.A., et al., *Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion*. J Cell Biol, 1990. 110(2): p. 529-40.
120. Smith, D.F., et al., *Leukocyte phosphoinositide-3 kinase {gamma} is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo*. J Leukoc Biol, 2006. 80(6): p. 1491-9.
121. Schaefer, M.B., et al., *Fatty acids differentially influence phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in endothelial cells: impact on adhesion and apoptosis*. Atherosclerosis, 2008. 197(2): p. 630-7.
122. Mayer, K., et al., *Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(2): p. H811-8.
123. Pluess, T.T., et al., *Intravenous fish oil blunts the physiological response to endotoxin in healthy subjects*. Intensive Care Med, 2007. 33(5): p. 789-97.

124. Mayer, K., et al., *Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(10): p. 1321-8.
125. Michaeli, B., et al., *Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers*. Clin Nutr, 2007. 26(1): p. 70-7.
126. Grimminger, F., et al., *Impact of arachidonic versus eicosapentaenoic acid on exotoxin-induced lung vascular leakage: relation to 4-series versus 5-series leukotriene generation*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 155(2): p. 513-9.
127. Grimminger, F., et al., *PAF-induced synthesis of tetraenoic and pentaenoic leukotrienes in the isolated rabbit lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 278(2): p. L268-75.
128. Sperling, R.I., et al., *Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils*. J Clin Invest, 1993. 91(2): p. 651-60.
129. Arakawa, H., et al., *Leukotriene D4- and prostaglandin F2 alpha-induced airflow obstruction and airway plasma exudation in guinea-pig: role of thromboxane and its receptor*. Br J Pharmacol, 1993. 110(1): p. 127-32.
130. Clemmer, T.P., et al., *Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group*. Crit Care Med, 1992. 20(10): p. 1395-401.
131. Dantzer, R., *Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?* Brain Behav Immun, 2001. 15(1): p. 7-24.
132. Arita, M., et al., *Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(21): p. 7671-6.
133. Schwab, J.M., et al., *Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes*. Nature, 2007. 447(7146): p. 869-74.
134. Haworth, O., et al., *Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation*. Nat Immunol, 2008. 9(8): p. 873-9.
135. Levy, B.D., et al., *Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness*. J Immunol, 2007. 178(1): p. 496-502.
136. Weissman, C., *The metabolic response to stress: an overview and update*. Anesthesiology, 1990. 73(2): p. 308-27.
137. Stoner, H.B., et al., *The effect of sepsis on the oxidation of carbohydrate and fat*. Br J Surg, 1983. 70(1): p. 32-5.
138. Mayer, K., et al., *Ernährung und Immunonutrition bei Sepsis*. Internist, 2006. 47: p. 374-382.
139. Calder, P.C., et al., *Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions*. Intensive Care Med, 2010. 36(5): p. 735-49.
140. Mayer, K., *Fettemulsionen während SIRS, fulminante SIRS und Sepsis*, in *Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin e.V.* 2004: Kloster Irsee.
141. Gogos, C.A., et al., *Medium- and long-chain triglycerides have different effects on the synthesis of tumor necrosis factor by human mononuclear cells in patients under total parenteral nutrition*. J Am Coll Nutr, 1994. 13(1): p. 40-4.
142. Wichmann, M.W., et al., *Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial*. Crit Care Med, 2007. 35(3): p. 700-6.
143. Wachtler, P., et al., *Influence of a total parenteral nutrition enriched with omega-3 fatty acids on leukotriene synthesis of peripheral leukocytes and*

- systemic cytokine levels in patients with major surgery.* J Trauma, 1997. 42(2): p. 191-8.
144. Pacht, E.R., et al., *Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome.* Crit Care Med, 2003. 31(2): p. 491-500.
 145. Rice, T.W., et al., *Enteral omega-3 fatty acid, gamma-linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury.* JAMA. 306(14): p. 1574-81.

13. Publikationsverzeichnis

1. K. Mayer, A. Kiessling et al., *Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 3/2009

14. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

15. Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die mich in der langen Zeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. K. Mayer danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit und die intensive Betreuung, vor allem während der Arbeit im Labor. Für die Unterstützung bei der Fertigstellung bedanke ich mich bei Herrn Dr. Matthias Hecker.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Juliane Ott, die immer ein offenes Ohr für alle Probleme und Fragen hatte und mir immer unterstützend zur Seite stand. Ich bedanke mich für die vielen und langen aufschlussreichen und interessanten Gespräche, die für das Gelingen der Arbeit von großer Bedeutung waren.

Desweiteren möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen während meiner Tätigkeit im Labor bedanken, deren lieben Worte und Taten mir viel Kraft gegeben haben: Andrea Mohr, Juliane Mest, Tobias Fischer, Christoph Sondermann, Dr. Minghua Bi, Britta Bausch.

Außerdem danke ich den Damen des Labors von Prof. Dr. Lohmeyer und Dr. Roth für die Erklärung und Bereitstellung einiger Gerätschaften.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die langen und motivierenden Gespräche und die Ermöglichung des Studiums und der Arbeit, und Thomas für die liebevolle Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6232-3



9 783835 196232